

УДК 616.233/24-007.17-036.12-07-053.2

Маркеры воспаления у детей с бронхолегочной дисплазией в стадии хронической болезни

С.Н. Козарезов

Белорусский государственный медицинский университет, 220000, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83 Республика Беларусь

Markers of inflammation at children's with bronchopulmonary dysplasia in chronic stage of disease

S.N. Kozarezov

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Аннотация

Целью работы явилось определение уровней цитокинов (IL-1 β , IL-12, IFN- γ) методом твердофазного иммуноферментного анализа и острофазных белков (С-реактивного белка, церулоплазмينا, гаптоглобина) иммунотурбидиметрическим методом у детей с бронхолегочной дисплазией (БЛД) в стадии хронической болезни и их оценка. Обследовано 66 детей в возрасте от 6 мес. до 3 лет., из них 34 – с БЛД и 32 практически здоровых ребенка. Повышение концентраций IL-1 β , IL-12, а также уровень лейкоцитов, при нормальных значениях СОЭ и острофазных белков подтверждают наличие хронически текущего воспаления низкой интенсивности с преимущественной активацией клеточного звена иммунитета.

Ключевые слова

Цитокины, острофазные белки, бронхолегочная дисплазия.

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) – приобретенное хроническое заболевание, развивающееся преимущественно у недоношенных детей и характеризующееся необратимыми изменениями бронхолегочной системы: фиброз, эмфизема, облитерирующий бронхолит, нарушение развития микроциркуляторного русла и задержка альвеологенеза. Необратимость этих изменений объясняет социальную значимость данной проблемы и почему для ее решения необхо-

Summary

The goal of the study was to detect and to appraise the rates of cytokines (IL-1 β , IL-12, IFN- γ) with ELISA technique and acute-phase proteins (CRP, ceruloplasmin, gaptoglobin) with immunoturbidimetric technique at children with bronchopulmonary dysplasia (BPD) in chronic stage of disease. There were 66 children at the age of 6 months to 3 years examined, 34 of them were with BPD and 32 – almost healthy children. The high concentrations of IL-1 β , IL-12, and also the level of leucocytes at the regular meanings of erythrocyte sedimentation rate and acute-phase proteins conforms the presence of chronic inflammatory process of low intensity with primary activity of immunity's cell link.

Key words

Cytokines, acute-phase proteins, bronchopulmonary dysplasia.

димо детальное изучение патофизиологических механизмов развития и течения заболевания.

БЛД на современном этапе рассматривается как полиэтиологическое заболевание, в основе развития которого лежат следующие факторы: недоношенность, генетическая предрасположенность, оксидантный стресс, ИВЛ, инфекция, недостаточное питание, дефицит витаминов и микроэлементов и др. Действуя кумулятивно и синергично, они

ведут к повреждению бронхолегочной системы и развитию воспаления за счет высвобождения провоспалительных медиаторов, хемоаттрактантов и притока клеток, которые потенцируют воспалительную реакцию посредством продукции еще большего количества цитокинов [1, 2, 3, 4]. Ранее было установлено, что у детей с БЛД, уже на первой неделе жизни имеются признаки воспаления в бронхолегочной системе, что подтверждают высокие уровни провоспалительных (интерлейкин (IL)-1, 6, 8 и TNF- α) и низкие уровни противовоспалительных (IL-10) цитокинов в образцах бронхоальвеолярной лаважной жидкости [5, 6]. Известно, что дефицит экспрессии противовоспалительных цитокинов макрофагами может предрасполагать к хроническому течению воспалительного процесса [5]. Кроме того, результаты гистологических и цитологических исследований указывают на повышенное количество клеток воспаления в ткани легких новорожденных детей, у которых в дальнейшем сформировалась БЛД [6].

Исследования, посвященные БЛД в стадии хронической болезни, практически отсутствуют. В отечественной литературе эту стадию заболевания некоторые авторы рассматривают как отдельную форму хронической обструктивной патологии легких у детей [7]. Так, результаты цитологического исследования бронхоальвеолярной лаважной жидкости у детей с БЛД в стадии хронической болезни показали, что смешанное (нейтрофильно-лимфоцитарное) воспаление и повреждение мерцательного эпителия дыхательных путей персистируют длительно – в течение первых семи лет жизни [8]. Однако механизмы разрешения воспалительного процесса и восстановления функции легких у детей с БЛД исследованы недостаточно. В связи с этим встает вопрос об обоснованности и рациональности длительного применения ингаляционных глюкокортикостероидов у данной группы пациентов [9]. Все вышеизложенное и послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Цель работы: определить и оценить уровни маркеров воспаления – цитокинов (IL-1 β , IL-12, IFN- γ) и острофазных белков (С-реактивного белка, церулоплазмينا, гаптоглобина) у детей с бронхолегочной дисплазией в стадии хронической болезни.

Материалы и методы

В исследование (2007 – 2008 гг.) включено 66 детей (М-36 и Д-30) в возрасте от 6 мес. до 3 лет. Все обследуемые были распределены на две группы: в основную группу вошло 34 пациента с БЛД в стадии хронической болезни, находившихся под динамическим наблюдением в городском амбулаторном пульмонологическом кабинете на базе УЗ «3-ая городская детская клиническая больница г. Минска»; в контрольную группу – 32 практически здоровых ребенка, наблюдавшихся в поликлиниках г. Минска. Диагноз и степень тяжести БЛД верифицированы согласно определению и классификации, принятыми на рабочем совещании по данной проблеме в 2000 году [10].

Критериями включения пациентов в исследование служили: основная группа – дети с БЛД в стадии хронической болезни, не имеющие на момент осмотра клинических данных в пользу инфекционного процесса; контрольная группа – практически здоровые дети, не болевшие по данным анамнеза и формы 112 в течение месяца до обследования острыми инфекционными заболеваниями. Для обследованных получены информированные согласия от родителей на проведение дополнительных исследований.

В работе были использованы следующие методы: анамнестические, клинические, гематологические, биохимические, иммунологические и статистические. Объектом для исследования служила плазма и сыворотка крови. Детям обеих групп определяли концентрации С-реактивного белка (СРБ), церулоплазмينا (ЦП) и гаптоглобина (ГГ) в плазме с помощью иммунотурбидиметрического метода при использовании диагностических наборов фирмы «Roche» (Германия) на анализаторе «Hitachi-912». Исследование концентрации IL-1 β , IL-12 и интерферона- γ (IFN- γ) в сыворотке проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем Immunotech a.s. (Франция).

Статистический анализ данных проводили с использованием коммерческого пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Результаты считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости менее 0,05. Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами, а количественных признаков – в формате: среднее значение (среднеквадратичное отклонение) – М (s) или

медиана (интерквартильный размах) – Ме (LQ/UQ) в зависимости от вида распределения. Проверка гипотез о виде распределения количественных признаков осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории медицинского микроанализа ИБОХ НАН Беларуси (зав., д.м.н., профессору Пивень Н.В.) за методическую и консультативную помощь при выполнении данной работы.

Результаты и их обсуждение

Оценка показателей периферической крови (ПК) у 34 больных с БЛД (количества лейкоцитов, лейкоцитарной формулы, СОЭ) проведена с учетом возраста (табл. 1). Уровень лейкоцитов в ПК детей в возрастных группах 6-12 мес. и 1-3 года находился на верхней границе возрастной нормы [11]. Его повышение отмечено у 3/18 и 3/16 детей соответственно, причем всем пациентам была выставлена тяжелая и средняя степени тяжести заболевания. Для объективного представления о происходящих изменениях в лейкоцитарной формуле учитывались относительные и абсолютные значения лейкоцитов. Не выявлено отклонений этих параметров от нормативных показателей в обеих возрастных группах [11]. Повышенный уровень лейкоцитов у 6 из 34 обследованных был обусловлен лимфоцитарным компонентом. У детей с БЛД в возрасте 6-12 мес. и 1-3 года значения СОЭ (4 (4/5)

и 5 (4/8) мм/ч соответственно) входили в диапазон нормативных значений.

Известно, что в развитии воспалительного процесса участвуют разнообразные молекулы-посредники, в том числе различные белки сыворотки, так называемые острофазные, обычно содержащиеся в ней в низкой концентрации. Нами определено содержание некоторых из них – СРБ, ЦП, ГГ, так как их уровни повышаются при различных острых и хронических воспалительных процессах, в том числе и инфекционной природы, и по их значениям можно судить не только о наличии воспалительного процесса, но и об его интенсивности.

Статистическому анализу полученных результатов по показателям – ЦП, ГГ, IL-1 β , IL-12 и IFN- γ предшествовало сравнение групп по возрасту и полу (табл. 2, 3, 4). При сопоставлении групп по возрасту использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимых различий по данному показателю между группами БЛД-контрольная: ЦП ($p=0,1$), ГГ ($p=0,06$), IL-1 β и IL-12 ($p=0,66$), IFN- γ ($p=0,36$) не обнаружено. С целью сравнения групп по полу проводился анализ таблиц сопряженности с использованием двустороннего точного критерия Фишера. Статистически значимых различий по этому показателю между группами БЛД-контрольная: ЦП ($p=1,0$), ГГ ($p=0,7$), IL-1 β и IL-12 ($p=1,0$), IFN- γ ($p=1,0$) также не выявлено. Полученные ре-

Таблица 1

Количественная характеристика лейкоцитарной формулы у детей с БЛД в зависимости от возраста [М (s); Ме (LQ/UQ)]

Показатель		Группы	
		БЛД 6-12 мес. n=18	БЛД 1-3 года n=16
Лейкоциты, 10 ⁹ /л		9,5 (9,1/11,6)	8,4 (7,1/11,0)
Эозинофилы	%	2 (2/2)	1 (1/2)
	абс. ч., 10 ⁹ /л	0,18 (0,12/0,32)	0,15 (0,1/0,2)
Нейтрофилы палочкоядерные	%	2 (2/3)	2,5 (2/4,5)
	абс. ч., 10 ⁹ /л	0,18 (0,15/0,35)	0,2 (0,15/0,5)
Нейтрофилы сегментоядерные	%	24,4 (6,0)	30,7 (11,0)
	абс. ч., 10 ⁹ /л	2,3 (2,0/3,0)	2,4 (2,0/3,6)
Лимфоциты	%	65,1 (7,2)	60,7 (12,6)
	абс. ч., 10 ⁹ /л	6,5 (2,5)	5,8 (2,1)
Моноциты	%	4 (2/7)	3 (2/5,5)
	абс. ч., 10 ⁹ /л	0,42 (0,19/0,64)	0,26 (0,14/0,64)

зультаты указывают на сопоставимость групп по полу и возрасту, что позволяет проводить дальнейший анализ данных.

При сравнении групп БЛД и контрольной (табл. 2) по уровням ЦП (критерий Стьюдента с отдельными оценками дисперсий; критерий Шапиро-Уилка: БЛД $p=0,49$ и контрольная $p=0,46$; для критерия Левена $p=0,02$) и ГГ (критерий Манна-Уитни) статистически значимых различий не найдено ($p=0,07$ и $p=0,35$ соответственно). Уровень СРБ в плазме крови всех детей обеих обследуемых групп находился в пределах нормы и составил менее 0,5 мг/дл.

Таким образом, совокупность полученных данных (количества лейкоцитов, уровней СОЭ, ЦП, ГГ и СРБ) указывает на отсутствие острого воспалительного процесса, в том числе и инфекционной природы, у детей с БЛД в стадии хронической болезни, а в случае наличия хронического воспалительного процесса на его низкую интенсивность.

Известно, что воспаление является иммунообусловленным процессом, в развитии которого включаются регуляторные звенья клеточного и гуморального иммунитета, функционирование которых опосредуется различными группами цитокинов [12]. Поэтому, следующим этапом работы было исследование в сыворотке крови концентрации цитокинов, относящихся к различным группам по своим функциональным свойствам: IL-1 β , IL-12 и IFN- γ .

IL-1 является белком синтез которого в организме начинается в ответ на появление чужеродных антигенных субстанций (антигенов микроорганизмов и собственных повреж-

денных тканей и др.) и считается главным медиатором развития местной воспалительной реакции и системного острофазового ответа, опосредуя развитие неспецифических форм иммунной защиты. Помимо этого IL-1 участвует в специфическом иммунном ответе, воздействуя на функциональную активность Т и В лимфоцитов [12, 13, 14].

Провоспалительный цитокин IL-12, продуцируемый макрофагами и антигенпрезентирующими клетками (моноцитами, дендритными клетками), является ростовым фактором и стимулятором дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Под его воздействием незрелые Т-хелперы дифференцируются в Т-хелперы I типа (Th1), что связано с индукцией синтеза ими IFN- γ , вследствие чего повышается активность натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов. IL-12 участвует в реакциях врожденного и приобретенного иммунного ответа [12, 15].

Результаты определения содержания IL-1 β и IL-12 в сыворотке крови обследуемых групп отражены в табл. 3. Анализ концентрации IL-1 β и IL-12 в сыворотке крови детей обеих обследуемых групп (БЛД-контрольная) обнаружил статистически высокозначимые различия по обоим показателям – $p<0,001$ и $p<0,001$, соответственно (критерий Стьюдента; при учете того, что значения признаков в обеих группах имеют распределения близкие к нормальному: критерий Шапиро-Уилка – БЛД (IL-1 β , $p=0,79$; IL-12, $p=0,54$) и контрольная (IL-1 β , $p=0,1$; и IL-12, $p=1,0$); и дисперсии распределений признаков равны – IL-1 β $p=0,94$ и IL-12 $p=0,37$ для критерия Левена).

Таблица 2
Содержание церулоплазмينا и гаптоглобина в плазме крови обследованных детей [M (s); Me (LQ/UQ)]

Группы	Количество детей	Показатели		
		Возраст, мес.	Пол, м/д	Уровень, мг/дл
БЛД	18	19 (14/25)	13/5	ЦП 41,4 (6,4)
	18	19 (14/25)	13/5	ГГ 76,5 (58,8/123,3)
Контрольная	18	14,5 (11/20)	12/6	ЦП 38,6 (4,1)
	11	14 (10/16)	9/2	ГГ 56,0 (41,4/112,0)

IFN- γ синтезируется главным образом активированными Т-лимфоцитами и натуральными киллерами. Среди Т-лимфоцитов его синтез и секреция осуществляется цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами 1-го типа. К его основным свойствам относят: активацию макрофагов и натуральных киллеров, прямую противовирусную активность и стимуляцию экспрессии антигенов МНС II, необходимых для более эффективного представления антигенов Т-лимфоцитам хелперам. Он также стимулирует продукцию IL-12 макрофагами и дендритными клетками и экспрессию лимфоцитами рецепторов к нему, тем самым, увеличивая активацию Th-1 [12].

В таблице 4 приведены данные по исследованию концентрации IFN- γ в сыворотке крови. Сравнительный анализ (критерий Манна-Уитни) по данному показателю не выявил статистически значимых различий ($p=0,61$) между группами. Однако следует заметить, что у 38,5% (5/13) детей с БЛД его уровень был статистически значимо (критерий Манна-Уитни, $p=0,005$) выше – 1,2 (1,2/1,3) МЕ/мл, по сравнению со значениями контрольной группы. На основании анализа клинической картины не удалось выявить связи между

уровнем IFN- γ и степенью тяжести болезни, а также частотой заболеваний с поражением респираторного тракта.

Можно полагать, что такая динамика цитокинов прежде всего связана с наличием хронической антигенной стимуляции в организме, которая может быть обусловлена присутствием различных чужеродных агентов. Микробные и вирусные антигены, с одной стороны, а с другой – измененные в ходе заболевания компоненты собственных тканей, являясь чужеродными по отношению к организму, могут способствовать поддержанию активации иммунной системы и воспалительной реакции. Кроме того, повышение уровня IL-12 у детей с БЛД в стадии хронической болезни указывает на преимущественную активацию клеточного звена иммунитета, опосредуемого участием Th-1 и цитотоксических лимфоцитов, защищая их организм от переключения механизмов иммунной защиты с клеточного на гуморальный, которое, в свою очередь, может существенно осложнить течение заболевания [16]. Это утверждение так же подтверждается повышением у части детей с БЛД уровня IFN- γ , посредством которого активируются клеточные реакции приобретенного и врожденного иммунитета.

Таблица 3
Концентрация IL-1 β и IL-12 в сыворотке крови обследуемых детей [М (s); Ме (LQ/UQ)]

Группы	Показатели			
	Возраст, мес.	Пол, м/д	IL-1 β , пг/мл	IL-12, пг/мл
БЛД n=20	11 (9/13,5)	9/11	21,4 (2,6)*	378,2 (39,3)*
Контрольная n=13	10 (7/22)	6/7	13,7 (2,7)*	157,7 (31,4)*

Примечание - * - статистически значимые различия по показателям между группами БЛД и контрольной

Таблица 4
Концентрация IFN- γ в сыворотке крови обследуемых детей [Ме (LQ/UQ)]

Группы	Показатели		
	Возраст, мес.	Пол, м/д	IFN- γ , МЕ/мл
БЛД n=13	9 (7/12)	8/5	0,75 (0,002/1,2)
Контрольная n=7	13 (7/15)	5/2	0,40 (0,004/0,6)

Заключение

Таким образом, на основании результатов наших исследований установлено отсутствие острого воспалительного процесса у детей с БЛД в стадии хронической болезни. Повышение концентраций IL-1 β , IL-12, а также уровень лейко-

цитов, при нормальных значениях СОЭ и острофазных белков подтверждают наличие хронически текущего воспаления низкой интенсивности с преимущественной активацией клеточно-го звена иммунитета у детей с БЛД в стадии хронической болезни.

Литература

1. Dani C., Cecchi A., Bertini G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minevra Pediatr.* 2004; 56: 381-94.
2. Davis J.M., Rosenfeld W. Chronic lung disease. In: Avery G.B., Fletcher M.A., MacDonald M.D., editors. *Neonatology*. 5ed ed. Philadelphia, PA: Lippincott; 1999: 509-32.
3. R.H. Clark, Gerstmann D.R., Jobe A.H. et al. Lung injury in neonates: causes, strategies for prevention, and long-term consequences. *J. Pediatr.* 2001; 139: 478-86.
4. De Dooy J.J., Mahieu L.M., Van Bever H.P. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. *Eur. J. Pediatr.* 2001; 160: 457-63.
5. Jones C.A. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr. Res.* 1996; 39: 966-75.
6. Ozdemir A., Brown M.A., Morgan W.J. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 1997; 23: 292-306.
7. Богданова А.В., Старевская С.В., Попов С.Д. Хроническая обструктивная болезнь легких у детей. СПб.; 2004.
8. Богданова А.В., Бойцова Е.В., Мурыгина Г.Л. Фармакотерапия при хронической обструктивной патологии легких у детей. М.: Медпрактика; 2002.
9. Bush A., Tiddens H., Silverman M. Clinical implications of inflammation in young children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. 162 (3): 11-4.
10. Jobe A.H., Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am. J. Crit. Care Med.* 2001; 163 (4): 1723-9.
11. Климович Н.Н., Козарезова Т.И. Клинико-диагностическое значение показателей периферической крови у детей. Мн.: БелМАПО; 2008.
12. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Издательство Фолиант; 2008.
13. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции. *Иммунология.* 2001; 5: 4-7.
14. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. М.: МИА; 2003.
15. Кадагидзе З.Г. Цитокины. Практическая онкология. 2003; 3: 131-9.
16. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. СПб.; 1998.

Козарезов Станислав Николаевич, аспирант кафедры детских болезней Белорусского государственного медицинского университета. Адрес: г. Минск, пр-т. газ. «Правда» 58-2-36. д.т. 8 (017) 2716432, м.т. 8 (029) 6716430, email: snkmed@ya.ru

Поступила 22.04.09 г.