

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ БРОНХОКОНСТРИКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

Проф. В. Г. Чернуский, доц. О. Л. Говаленкова, доц. А. В. Летяго, доц. В. Л. Кашина-Ярмак, Д. А. Сальников
Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

В патогенезе бронхиальной астмы у детей вне зависимости от особенностей этиологии развивается аутоиммунный компонент, запускающий продукцию сенсibilизированными Т-лимфоцитами провоспалительных цитокинов, обуславливающих развитие хронического аллергического воспаления в бронхолегочной системе. Цель работы — изучение в эксперименте провоспалительных цитокинов сенсibilизированных Т-лимфоцитов, обладающих бронхоконстрикторными свойствами. Результаты исследований — на разработанной экспериментальной модели бронхиальной астмы у морских свинок показано, что сенсibilизированные Т-лимфоциты, полученные от детей, больных бронхиальной астмой, культивированные с гомологичным липополисахаридным антигеном легочной ткани, продуцируют в надосадочную жидкость цитокины, которые при внутривенном введении экспериментальным животным способны самостоятельно вызывать развитие бронхоспазма. Исследования являются перспективными для проведения дифференциальной диагностики бронхоспазма и уточнения диагноза бронхиальной астмы у детей, а также новых подходов к разработке патогенетической терапии заболевания.

Ключевые слова: бронхиальная астма, сенсibilизированные Т-лимфоциты, цитокины, липополисахаридные антигены бронхолегочной системы, дети.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО- КЛІНІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ БРОНХОКОНСТРИКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У РАЗІ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ В ДІТЕЙ

Проф. В. Г. Чернуський, доц. О. Л. Говаленкова,
доц. Г. В. Летяго, доц. В. Л. Кашина-Ярмак, Д. О. Сальников

У патогенезі бронхіальної астми в дітей незалежно від особливостей етіології розвивається аутоімунний компонент, що запускає продукцію сенсibilізованими Т-лімфоцитами прозапальних цитокинів, які зумовлюють розвиток хронічного алергічного запалення в бронхолегеневій системі. Мета роботи — вивчення в експерименті прозапальних цитокинів сенсibilізованих Т-лімфоцитів, що мають бронхоконстрикторні властивості. Результати досліджень — на розробленій експериментальній моделі бронхіальної астми в морських свинок доведено, що сенсibilізовані Т-лімфоцити, отримані від дітей, хворих на бронхіальну астму, культивовані з гомологічним ліпополісахаридним антигеном легеневої тканини, продукують в надосадову рідину цитокини, які в разі внутрішньовенного введення експериментальним тваринам можуть самостійно викликати розвиток бронхоспазму. Дослідження є перспективним для проведення диференційної діагностики бронхоспазму й уточнення діагнозу бронхіальної астми в дітей, а також формування нових підходів до розробки патогенетичної терапії захворювання.

Ключові слова: бронхіальна астма, сенсibilізовані Т-лімфоцити, цитокини, ліпополісахаридні антигени бронхолегеневої системи, діти.

EXPERIMENTAL AND CLINICAL SUBSTANTIATION BRONCHOCONSTRICTOR PROPERTIES OF INFLAMMATORY CYTOKINES IN CHILDREN WITH ASTHMA

V. G. Chernusky, O. L. Govalenkova, A. V. Letyago,
V. L. Kashina-Yarmak, D. A. Salnikov

In the pathogenesis of asthma in children, regardless of the etiology of the case features of an autoimmune component triggering the production sensitized T-lymphocytes inflammatory cytokines cause the development of chronic allergic inflammation in the broncho-pulmonary system. Purpose — to study experimentally proinflammatory cytokines sensitized T-lymphocytes that have bronchoconstrictor properties. Results Studies — on the developed an experimental model of asthma in guinea-pigs demonstrated that sensitized T cells obtained from children with asthma cultured with homologous lipopolysaccharide antigen lung tissue produce a supernatant cytokines which when administered intravenously to experimental animals is capable of independently induce bronchospasm development. Studies are promising for the differential diagnosis of bronchospasm and refine the diagnosis of asthma in children, as well as new approaches to the development of pathogenetic therapy of the disease.

Keywords: bronchial asthma, sensitized T-lymphocytes, cytokines, lipopolysaccharide antigens bronchopulmonary system, children.

Согласно национальным и международным документам, GINA (2012, 2013) по бронхиальной астме (БА), данное заболевание рассматривается с позиций хронического воспаления бронхолегочной системы, в этиологии и патогенезе которого возрастает удельный вес полиэтиологического фактора, в том числе и инфекционного, под влиянием которого формируется сенсibilизация по Т-системе иммунитета и переключение иммунного ответа с Th₁ на Th₂ [4, 5, 6].

Развиваясь на фоне вторичного иммунодефицитного состояния и прогрессирующей сенсibilизации организма ребенка как экзо-, так и эндоаллергенами, формируется аутосенсibilизация, ухудшающая возможность элиминации чужеродных агентов из организма ребенка. При этом происходит истощение контролирующих защитных клонов антител в различных системах и органах, в том числе и в бронхолегочной системе. В результате этого снижается avidность и аффинность гуморальных антител к вирусно-бактериальным агентам, что создает ситуацию невозможной их элиминации иммунокомпетентными системами и развитие хронического воспалительного процесса в бронхолегочной системе с включением реакций гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) с продукцией специфических лимфокинов (цитокинов), усугубляющих течение БА у детей. Привлечение в бронхолегочную систему эффекторных клеток — макрофагов, нейтро-, базо- и эозинофилов, тучных клеток, лимфо- и тромбоцитов, продуцирующих биологически активные вещества (гистамин, брадикинин, простагландины, лейкотриены, тромбоксаны, цитокины), — вызывает повреждение тканей, прежде всего эпителия бронхов, а также возникновение отека, гиперреактивности, гиперсекреции и бронхоспазма. При этом обращает на себя внимание специфичность выбрасываемых эффекторными клетками цитокинов, которые могут проявлять бронхоконстрикторные свойства [3, 8, 9, 10].

Цель работы — изучение в эксперименте провоспалительных цитокинов сенсibilизированных Т-лимфоцитов, обладающих бронхоконстрикторными свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 60 морских свинках аутбредного стока, предварительно иммунизированных по разработанному нами способу воспроизведения БА [14]. Перед опытом у животных в течение 2 сут проводили ежедневную двукратную термометрию, оценивали общее клиническое состояние животных, выраженность инстинктов и рефлексов, ритм сердечных сокращений и частоту дыхания. Через 3 сут морские свинки были включены в исследования по оценке цитокинов сенсibilизированных Т-лимфоцитов, полученных от детей, больных БА, обладающих бронхоконстрикторными свойствами. Цитокины Т-лимфоцитов выделяли от 25 здоровых и 25 больных БА детей по методике Н. В. Медуница и др. [7]. Затем проводили иммунизацию животных путем внутривенного введения соответствующих цитокинов Т-лимфоцитов в объеме 0,5 мл.

Белковые водно-солевые экстракты из клеточнотканевых структур бронхолегочной системы морских свинок получали по методу Е. Ф. Чернушенко и др. [12].

Липополисахаридные антигены из гомологичных клеточнотканевых структур трахеи, бронхов и легочной ткани получали по методу В. Д. Яковенко и др. [1].

Полученные данные обрабатывали статистически методом вариационного ряда по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Главным механизмом развития БА является выделение медиаторов эффекторными клетками под влиянием специфического антигена [2, 9, 10].

В развитии БА участвуют как тучные клетки (базофилы), так и другие эффекторные клетки (макрофаги, лимфо-, лейко- и тромбоциты, эозинофилы). Если тучные клетки детерминируют главным образом ранний ответ при БА, который проявляется в виде бронхоспазма на специфический антиген (аллерген), то механизмы позднего ответа намного сложнее и связаны с эффекторными клетками, продуцирующими цитокины, обуславливающие

развитие стойкой обструкции бронхов и продукции вязкого секрета, в котором содержатся данные эффекторных клетки. При переходе раннего ответа при БА в поздний специфические аллергены нередко отходят на второй план. В первую очередь проявляется влияние специфических медиаторов эффекторных клеток на структуры бронхолегочной системы с развитием деструкции. При этом на «секвестранты» вырабатываются аутоантитела и создаются условия для прогрессирования хронического воспаления уже на новой морфофункциональной основе [2, 13, 15].

В связи с этим важно подчеркнуть, что аллергонеактивированные тучные клетки/базофилы вырабатывают серию цитокинов, в том числе ИЛ-3, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), повышающий чувствительность к стимулам и адгезивность эндотелия бронхов. В формировании гиперреактивности бронхов (ГРБ) участвует не какой-то один тип клеток, а под влиянием цитокинов сенсibilизированных Т-лимфоцитов — весь ансамбль взаимодействующих клеток из зоны воспаления, состоящий из эозино- и нейтрофилов, Т- и В-клеток, макрофагов. Эти клетки взаимно стимулируют друг друга, что поддерживает воспроизводство хронического воспалительного процесса в бронхолегочной системе и ГРБ. Надо отметить, что макрофаги — не только эффекторы воспаления при БА, но и «партнеры» лимфоцитов по специфическим реакциям иммунитета. При БА эта функция связана с измененной реакцией презентации иммунокомпетентным системам как экзо-, так и эндоаллергенов, что создает возможность их персистенции и извращенной реакции иммунной системы и поддержания ГРБ. В закреплении ГРБ важную роль играют не только клетки-эффекторы, но и медиаторы, продуцируемые эпителием бронхов. Интактный эпителий вырабатывает медиаторы, расслабляющие гладкую мускулатуру бронхов, и инактивирует медиаторы эффекторных клеток, оказывающих бронхоконстрикторное действие при раннем и позднем ответе. Повреждение и слущивание эпителия в зоне

аллергического воспаления под влиянием цитокинов сенсibilизированных Т-лимфоцитов и медиаторов ансамбля эффекторных клеток поддерживают стойкую ГРБ и, наоборот, медиаторы, выделяемые интактным эпителием, предупреждают развитие ГРБ [2, 6, 8, 11].

В качестве экспериментальной модели использованы 60 морских свинок аутбредного стока как вид лабораторных животных, высокочувствительных к индукции аллергических и аутоиммунных реакций. При формировании групп экспериментальных животных мы учитывали возраст — 4,5–5 мес., живую массу 400–450 г, а также пол животных: 30 самцов и 30 самок. Все животные находились в условиях содержания, соответствующих международным нормам GLP. Перед проведением опытов у экспериментальных животных в течение 3 сут проводилась ежедневная двукратная ректальная термометрия ($38,5 \pm 2,3$), оценивалось общее клиническое состояние, выраженность инстинктов и рефлексов, а также измерялись ритм сердечных сокращений ($350 \pm 21,2$) и частота дыхания ($130 \pm 12,6$) в минуту. При разработке методики воспроизведения БА у морских свинок нами были максимально учтены различные аспекты ее клинических форм. Базовым при этом являлось активирование экзогенной и эндогенной микрофлоры, персистирующей в респираторном тракте за счет направленного снижения иммунного гомеостаза. При этом учитывалось, что формированию БА в подавляющем большинстве случаев предшествуют как острые (грипп, парагрипп, аденовирусные инфекции, бронхиты, пневмонии и др.), так и хронические заболевания (тонзиллит, фарингит и др.), которые универсально способствуют формированию «секвестрированных» антигенов из структур бронхов и легочной ткани, в норме являющихся «запретными» для иммунной системы организма.

В разрабатываемой методике в качестве «секвестрированных» антигенов нами использованы водно-солевые экстракты легочной ткани, взятые у морских свинок. Полученные антигены стандартизовались по количеству содержанию белка. Водно-солевой

антиген готовили путем размельчения ножницами легочной ткани с последующей промывкой проточной водой в течение 24 ч, а затем несколько раз заливали стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Объем ткани измеряли в стерильном мерном цилиндре и определяли уровнем жидкости. Легочную ткань подвергали гомогенизации. К одной ее части добавляли 4 части изотонического раствора натрия хлорида. Полученную однородную смесь отстаивали при температуре 4°C и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 45 мин. Надосадочная жидкость, водно-солевая вытяжка легочной ткани и являлась антигеном, которая содержала 1,5–2 % белка [12]. Применение легочного антигена при подкожной гипериммунизации подопытных морских свинок способствовало прогрессивному нарастанию в сыворотке крови животных соответствующих антител, которые отличались цитотоксичностью и поэтому — способностью к деструктивному воздействию на соответствующие клеточные элементы. Апробация различных схем гипериммунизации позволила отработать оптимальную, которая заключается во внутрикожном введении в область брюшной поверхности морских свинок водно-солевого легочного антигена в дозах 0,1–0,5–1,0–1,5 мл с интервалом между инъекциями 2–3 сут. Контроль за развитием аутоиммунного статуса у животных осуществляли путем периодической оценки нарастания в сыворотке крови титра аутоантител к легочному антигену. На выходе гипериммунизации титр противолегочных аутоантител в среднем составлял 1 : 890,45 ± 71,64. Вместе с этим, наблюдения за гипериммунизированными животными показали, что наличие высокого титра цитотоксических противолегочных аутоантител не приводило к клиническим проявлениям БА.

Это в целом согласуется с обширным клиническим опытом, который свидетельствует о том, что перенесенные острые бронхиты и пневмонии иммунологически характеризуются значительными титрами аутоантител, не имеют закономерной трансформации в БА. Отказ аутоиммунным сдвигам в значении индуктивного фактора при формировании БА

привел нас к необходимости активирования индигенной микрофлоры респираторных путей на фоне созданного аутоиммунного статуса. Учитывая, что одними из возбудителей бронхолегочных заболеваний выступают пиогенные кокки, мы для их активации через 10–15 дней использовали повторную гипериммунизацию подопытных морских свинок коммерческим препаратом стрептолизин-О. Для гипериммунизации животных использовано внутрикожное введение стрептолизина-О в дозах: 0,1–0,2–0,3–0,4–0,5 мл с интервалом между инъекциями 1–2 сут. На выходе титр антител к стрептолизину-О в среднем составил 1:780,42 ± 59,48. В итоге комплексной иммунизации легочным антигеном и стрептолизин-О у подопытных морских свинок клинически формировалась БА, в продроме которой регистрировались одышка, прерывистое дыхание, катаральные явления, а затем формировался астматический статус (частота дыхания в минуту — 64,8 ± 11,3–71,3 ± 7,5, ритм сердечных сокращений в минуту — 597 ± 9,6 и частота приступов в течение суток — 2,98 ± 0,23–3,12 ± 0,14), который прогрессировал по тяжести состояния вплоть до гибели животных через 25–30 сут после комплексной иммунизации.

Наряду с разработанной моделью БА, нами проведены исследования по оптимальному сопоставлению динамики формирования БА в эксперименте и в клинике.

Согласно положениям Национальных и международных документов, GINA (2012, 2013) в развитии БА ведущее значение принадлежит хроническому воспалительному процессу, который сопровождается гиперпродукцией цитокинов сенсibilизированными Т-лимфоцитами.

Исходя из этого, в повестку исследования вынесено положение о том, что при БА вне зависимости от особенностей этиологии идет развитие аутоиммунного процесса, сопровождающегося активацией сенсibilизированных Т-лимфоцитов по продукции провоспалительных цитокинов.

Обосновывая это положение, мы провели опыты, в основу которых положили изучение

самостоятельного влияния цитокинов Т-лимфоцитов, полученных от здоровых и страдающих БА детей, на развитие экспериментального бронхоспазма. Опыты проведены следующим образом. Т-лимфоциты, соответственно выделенные из 5 мл венозной крови от 25 здоровых и 25 детей, больных БА, культивировали в двух флаконах в среде 199 в течение 24 ч при температуре 37° С, в которые в качестве митогена был добавлен гомологичный липополисахаридный антиген легочной ткани в дозе 0,03 г/л [1, 11].

После этого, используя разработанный выше способ воспроизведения БА, проводили иммунизацию 30 морских свинок, которую завершали внутривенным введением соответствующих цитокинов в объеме 0,5 мл. В результате проведенных опытов установлено, что разрешающее введение цитокинов Т-лимфоцитов от детей, больных БА, культивированных в среде 199 с гомологичным липополисахаридным антигеном легочной ткани, способствовало немедленному развитию у животных приступного периода БА с продолжительным астматическим статусом с частотой дыхания в минуту — $64,8 \pm 11,3$ – $71,3 \pm 7,5$, ритмом сердечных сокращений в минуту — $597 \pm 9,6$ и частотой приступов в течение суток — $2,98 \pm 0,23$ – $3,12 \pm 0,14$, ректальной температурой — $42,5 \pm 3,8$. В то же время в контрольной группе, которую составили 15

животных, аналогичное введение цитокинов Т-лимфоцитов от здоровых детей, культивированных в среде 199 с гомологичным липополисахаридным антигеном легочной ткани, не сопровождалось развитием клинических проявлений БА.

Показатели частоты дыхания, ритма сердечных сокращений в 1 мин и ректальной температуры оставались в пределах нормативных показателей (частота дыхания — $130 \pm 12,6$, ритм сердечных сокращений — $350 \pm 21,2$, ректальная температура — $38,5 \pm 2,3$).

ВЫВОДЫ

Полученные результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что цитокины сенсibilизированных Т-лимфоцитов детей, больных БА, культивированные с гомологичным липополисахаридным антигеном легочной ткани, могут самостоятельно обуславливать развитие бронхоспазма.

Разработанная модель БА у морских свинок имеет диагностическое значение и может быть использована для установления и уточнения диагноза БА у детей.

Исследования являются перспективными для усовершенствования проведения дифференциальной диагностики бронхоспазма и уточнения диагноза БА у детей, а также могут использоваться при разработке новых подходов патогенетической терапии заболевания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. А. с. 1084025 СССР, МКИ 5, А 61 К 39/00. Способ получения тканевого аллергена для диагностики аутоаллергических процессов при хроническом тонзиллите / В. Д. Яковенко, А. Д. Базавлук, Г. П. Черкасс. — № 1084025, заявл. 11.10.82, опубл. 09.12.84. — Бюл. № 13.
2. А. с. 1728806 СССР, G 01 N33/53. Способ диагностики инфекционно-аллергических и аутоиммунных заболеваний / И. Л. Дикий, Е. Г. Дубенко, В. Г. Чернуский. — № 33853, заявл. 30.11.89, опубл. 23.04.92. — Бюл. № 15.
3. Демьянов А. В. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике / А. В. Демьянов, А. Ю. Котов, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 3. — С. 20–33.
4. Детская аллергология. Руководство для врачей / Под ред. А. А. Баранова, И. И. Балаболкина. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 688 с.
5. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Дранник. — М. : Медицинское информационное агентство, 2003. — 603 с.
6. Клиническая иммунология и аллергология : учебное пособие / Под ред. А. В. Караулова. — М. : Медицинское информационное агентство, 2002. — 651 с.

7. Медуницын Н. В. Медиаторы клеточного иммунитета и межклеточного взаимодействия / Н. В. Медуницын, В. И. Литвинов, А. М. Мороз. — М. : Медицина, 1980. — 262 с.
8. Намазова Л. С. Роль цитокинов в формировании аллергических реакций у детей / Л. С. Намазова, В. А. Ревякина, И. И. Балаболкин // Педиатрия. — 2000. — № 1. — С. 56–68.
9. Попов М. М. Алергічні хвороби : керівництво для практичних лікарів / М. М. Попов, Е. М. Солошенко, В. Г. Чернуський. — Х. : Форт, 2011. — 290 с.
10. Система цитокинов и болезни органов дыхания / Б. И. Гельцер, Е. В. Маркелова, Е. В. Просякова [и др.] // Терапевтический архив. — 2002. — Т. 74, № 11. — С. 94–99.
11. Спонтанный и липополисахаридиндуцированный синтез цитокинов клетками крови человека в норме и при алергопатологии / Е. Г. Исаченко, Т. И. Виткина, С. А. Геронина [и др.] // Иммунология. — 1999. — № 5. — С. 37–39.
12. Чернушенко Е. Ф. Иммунологические исследования в клинике / Е. Ф. Чернушенко, К. С. Когосова. — К. : Здоров'я, 1978. — 159 с.
13. Bradding P. Human mast cell cytokines / P. Bradding // Clin. Exp. Allergy. — 1996. — Vol. 26. — P. 13–19.
14. European Convention for the protection of the vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Strasbourg. Council Treat Series.—1987. — Vol. 123. — 52 p.
15. Hendeles L. Evaluation of cytokine modulators for asthma / L. Hendeles, M. Asmus, S. Chesrown // Paediatr Respir Rev. — 2004. — № 5, Suppl A. — P. 107–112.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН ХМАПО ПЛАТНИХ ЦИКЛІВ СПЕЦІАЛІЗАЦІЇ Й УДОСКОНАЛЕННЯ ЛІКАРІВ НА 2016 РІК

КАФЕДРА СЕКСОЛОГІЇ, МЕДИЧНОЇ ПСИХОЛОГІЇ, МЕДИЧНОЇ ТА ПСИХОЛОГІЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ

Зав. кафедри проф. Є. В. Кришталь тел. 725-06-76

Клінічна психологія (для лікарів лікувального профілю, педіатрів)	31.10–29.11
Сучасні питання медичної психології та сексології в сімейній медицині (для лікарів лікувального профілю, лікарів-педіатрів)	30.11–29.12
Наркологія (для лікарів, які атестуються на II, I, вищу категорії), м. Київ	28.09–28.10
Актуальні проблеми замісної терапії осіб з опіоїдною залежністю в загальній медицині (для лікарів лікувального профілю, сімейних лікарів), м. Київ	31.10–29.11

КАФЕДРА СІМЕЙНОЇ МЕДИЦИНИ, НАРОДНОЇ ТА НЕТРАДИЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ, САНОЛОГІЇ

Зав. кафедри проф. С. П. Шкляр тел. 725-26-99; 093-553-26-72

Санологія (для лікарів, які атестуються на II, I, вищу категорії)	29.08–27.09
Санологія (для лікарів лікувального, педіатричного, медико-профілактичного профілю)	19.09–19.12
Народна та нетрадиційна медицина (для лікарів, які атестуються на II, I, вищу категорії)	29.09–28.10
Стажування. Загальна практика–сімейна медицина (для лікарів, які підтверджують звання лікар-спеціаліст)	31.10–29.11