

Шуганов Александр Евгеньевич

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ
У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ**

14.01.04 – внутренние болезни.

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва-2018

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН

Палеев Филипп Николаевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, **Салмаси Жеан Мустафаевич**

Официальные оппоненты:

Цветкова Ольга Александровна, доктор медицинских наук, профессор ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), кафедра госпитальной терапии №1, профессор кафедры.

Ненашева Наталья Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения РФ, кафедра клинической аллергологии, профессор кафедры.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО Московский Государственный Медико-Стоматологический Университет им. А.И. Евдокимова МЗ РФ.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 года в «___» часов на заседании объединённого диссертационного совета Д 999.052.02 на базе ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70) , ГБУЗ МО МОНИКИ им М.Ф. Владимирского (129110, г. Москва, ул. Щепкина 61/2).

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке Института усовершенствования врачей ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России по адресу: 105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 65 и на сайте www.pirogov-center.ru.

Автореферат разослан «___» февраля 2018 г.

Ученый секретарь объединённого диссертационного совета,

доктора медицинских наук, профессор

Матвеев Сергей Анатольевич

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких) является 4-ой лидирующей причиной смертности в мире (Чучалин А.Г. и др., 2014). В развитых странах общие экономические расходы, связанные с данной патологией в структуре легочных заболеваний, занимают 2-ое место после рака легких и первое – по прямым затратам, превышая расходы на бронхиальную астму (БА) в 1,9 раза (Белевский А.С., Визель А.А. и др., 2015). По данным Всемирной организации здравоохранения, численность больных БА в мире составляет около 300 млн. человек. В клинической практике часто встречаются пациенты, у которых имеются характерные признаки обеих нозологических форм, что влечет за собой определенные трудности диагностики и лечения этих заболеваний (GOLD, 2016, Parairwannau A., Zarogoulidis P., Porpodis K. et al., 2014). Некоторые больные БА являются курильщиками и имеют клинические проявления болезни, схожие с ХОБЛ, но с преобладанием нейтрофильного воспаления и с худшим ответом на терапию бронхорасширяющими средствами или глюкокортикостероидами (Ненашева Н.М., 2013, Wylam M., Sathish V., Van Oosten et al., 2015). Более того, встречаются больные ХОБЛ с особенностями клинической картины, характерными для БА, такими как повышенный уровень эозинофилов в мокроте и существенная обратимость после применения бронхорасширяющего средства (Шпагина Л.А, Шпагин И.С., 2016).

До настоящего времени не сложилось четкого представления о причинах персистирующего воспаления, что затрудняет до конца понять не только патогенез заболевания, но и пути эффективного лечения и определения прогноза заболеваний (Сергеева Г.Р., 2010 г., Vafadhel M. et al., 2011).

В настоящее время существенную роль в инициации, формировании и поддержании хронического воспаления при этих заболеваниях отводят нарушениям адаптивного иммунного ответа, оценить которые можно изучая

экспрессию лимфоцитами активационных маркеров и мембранных иммуноглобулинов (Булгакова В.А., Смирнов И.Е. и др., 2014, Балабокин И.И., 2014, Ушкалова Е.А., 2016).

Исходя из изложенного, представляется актуальным проведение комплексного анализа иммунологических показателей (в частности, активационного профиля субпопуляций лимфоцитов) у больных с ХОБЛ и БА в период обострения и ремиссии для возможности дальнейшей оптимизации диагностических и лечебных мероприятий.

Цель исследования.

Разработать новые подходы в оценке активности и прогрессирования воспаления у больных ХОБЛ и БА на основе полученных клинико-иммунологических показателей и проведения дифференциальной диагностики этих заболеваний.

Задачи исследования.

1. Изучить функциональные характеристики лимфоцитов периферической крови у больных ХОБЛ и БА.
2. Оценить роль нарушения апоптоза в патогенезе ХОБЛ и БА.
3. Определить наиболее информативные клинико-иммунологические параметры, характеризующие особенность воспаления у больных ХОБЛ и БА и разработать иммунологический алгоритм дифференциальной диагностики этих заболеваний.
4. Оценить роль курения в патогенезе бронхиального и системного воспаления на ранних стадиях ХОБЛ.

Научная новизна.

Впервые проведено изучение широкой панели поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD54, CD56, CD71, CD72, HLA-DR, CD95, мембранные иммуноглобулины mIgM и mIgG), включающей как маркеры популяций и субпопуляций лимфоцитов, так и маркеры их активации при ХОБЛ и БА.

Впервые проведен репрезентативный количественный анализ поверхностных маркеров лимфоцитов, включающий изучение активационных маркеров и маркеров апоптоза лимфоцитов у больных ХОБЛ и БА.

Впервые показано увеличение содержащихся в крови у больных ХОБЛ цитотоксических лимфоцитов, НК – клеток и клеток адгезии как в период обострения, так и во время ремиссии. Доказано, что у больных ХОБЛ персистирующее воспаление сопровождается менее высокой готовностью лимфоцитов периферической крови к развитию апоптоза, независимо от активности клинических проявлений болезни.

Уточнена роль курения в развитии «оксидантного» стресса у больных ХОБЛ на ранних стадиях болезни, его связь с выявленными системными, иммунологическими нарушениями при этом заболевании.

Научно-практическая значимость.

Выполненное исследование позволит расширить представления о причинах персистирующего воспаления при ХОБЛ и БА. Поскольку нарушение апоптоза клеток, участвующих в развитии воспаления, считается одной из причин хронизации процесса, решение вопроса о ведущих механизмах апоптоза в лимфоцитах периферической крови имеет принципиальное значение как для дальнейших медико-биологических исследований, так и для клинической практики при ХОБЛ и БА.

Выявленные различия в показателях иммунной системы могут быть использованы как в дифференциальной диагностике, так и для определения «иммунологической» ремиссии при ХОБЛ и БА. Предложен алгоритм дифференциальной диагностики этих заболеваний. Это позволит более точно и патогенетически оправданно проводить медикаментозную и иммунокорректирующую терапию у больных ХОБЛ и БА.

В ходе исследования уточнен вклад курения в развитие системных иммунологических нарушений на ранних стадиях ХОБЛ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Имеются существенные различия в содержании поверхностных антигенов лимфоцитов в крови БА и ХОБЛ - при последней повышено содержание в крови цитотоксических CD 8 и NK- клеток. Значительное их увеличение при ХОБЛ свидетельствуют об активном иммунологическом процессе не только в период обострения, но и ремиссии.

2. У больных ХОБЛ и БА, независимо от стадии заболевания, сохраняется повышенное содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих ранние маркеры активации.

3. У больных ХОБЛ и БА имеется высокая иммунологическая активность В-клеточного звена иммунитета, что является отражением постоянно поддерживаемого процесса антигенной стимуляции при хроническом течении болезни.

4. Для ХОБЛ характерен невысокий уровень апоптоза из-за низкого содержания лимфоцитов, экспрессирующих FasL-антиген.

5. На начальных этапах в развитии воспаления дыхательных путей при ХОБЛ у курящих больных преобладает роль «оксидативного стресса» и отсутствуют данные о вкладе курения в «адаптивный» иммунный ответ.

Внедрение в практику результатов исследования.

Полученные результаты внедрены в практическую деятельность отделения профпатологии и ВТЭ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского и в ГБУЗ «Клинико-диагностический центр № 4 ДЗ г. Москвы».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.04 – внутренние болезни. Результаты проведенного исследования соответствуют областям специальностей, конкретно пунктам 2,3 паспорта внутренних болезней.

Апробация работы.

Диссертационная работа была апробирована на совместном заседании секции «Терапия» Ученого совета и кафедры терапии ФУВ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского 10.10.17 г.

Основные положения диссертации были изложены на Международной научно-практической конференции (Польша, 2014), 23-ем Международном конгрессе (Валенсия, Испания, 2014).

Личный вклад автора.

Вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, их теоритической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, на международных конференциях и их внедрении в практику. Практическая реализация заключалась в личном определении автором основных иммунологических показателей у обследуемых больных, проведении всем пациентам спирометрии с бронхолитиком, в подборе больных, интерпретации результатов, полученных при обследовании, в статистической обработке и анализе полученных данных.

Публикации.

Основные результаты диссертации опубликованы в 12 научных работах, которые опубликованы в журналах, 9 из которых входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, определенных Высшей аттестационной комиссией РФ.

Объем и структура работы.

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, результатов собственных данных, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературных источников, включающих 131 отечественных и 181 зарубежных источников. Диссертация содержит 10 таблиц, 17 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования.

Всего обследовано 100 больных: 50 с диагнозом ХОБЛ средней степени тяжести (ОФВ1>50%, ИТ<70%, mMRC 0-1) по GOLD 2016, средний возраст $56,4 \pm 1,44$ лет (40 мужчин и 10 женщин). Для уточнения роли курения на клинико-иммунологические показатели у больных ХОБЛ средней степени тяжести была определена группа из 20 пациентов, у которых отсутствовали данные о приверженности к табакокурению, средний возраст составил $58,21 \pm 0,7$ года. И 30 пациентов - курящие, средний возраст $54,1 \pm 1,3$ лет. 50 больных страдали БА легкой и средней степени тяжести (GINA 2015). Из них 26 женщин и 24 мужчин, средний возраст $38 \pm 2,0$. Контрольная группа состояла из 22 практически здоровых доноров (12 мужчин и 10 женщин), средний возраст $50,1 \pm 1,1$. Для верификации диагноза всем пациентам проводились лабораторные (клинические и б\х исследования крови) и инструментальные исследования (исследование функции внешнего дыхания с вентолиновой пробой (400 мкг), электрокардиография, рентгенография органов дыхания).

Для изучения иммунологического статуса, использовали метод непрямой иммунофлюоресценции с целью определения содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены и мембранные иммуноглобулины. Анализ крови проводился в начале обострения (до назначения ГКС, антибиотиков) и в клинически стабильном состоянии (без применения гормонов как минимум в течении 4-х недель).

У всех обследуемых больных ХОБЛ определяли состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ). Анализировали следующие показатели ПОЛ: уровень малонового диальдегида (МДА) по методу Банкова В.В., Юркова Ю.А., 1986; гидроперекисей липидов (ГПЛ) по методу Гаврилова В.Б., Мишкорудной М.И., 1983; активность супероксиддисмутазы (СОД) по методу Beanchamp С., 1971 и глутатионпероксидазы (ГП) по методу Ланкина В.З., 1976.

Статистический анализ.

Определение достоверности полученных результатов проводили при большой выборке с помощью критерия *t* Стьюдента, при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариант - с применением непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Расчеты проводили на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ "Statistica". В таблицах указаны средние арифметические значения соответствующего параметра и его средняя ошибка ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Было установлено, что в группе больных БА количество CD4 – лимфоцитов в обе фазы заболевания было достоверно ниже, чем в группе контроля. У больных БА отмечено достоверное снижение CD 3 – лимфоцитов в стадии обострения и ремиссии (таблица 1). Это снижение происходит как за счет уменьшения хелперно-индукторных лимфоцитов CD4, так и в результате снижения количества CD8. Отражением этих изменений является достоверное повышение соотношения CD4/CD8 (иммунорегуляторный индекс) с $1,42 \pm 0,04$ в группе контроля до $1,65 \pm 0,005$ у больных БА ($p < 0.001$).

У больных ХОБЛ наблюдается снижение содержания Т-лимфоцитов (CD3) в обе стадии заболевания, при этом в стадии ремиссии они были более выраженными (таблица 1). Низкое содержание CD4 – лимфоцитов отмечено только в стадии обострения заболевания, в период ремиссии этот показатель не отличался от группы контроля (таблица 1). Другая субпопуляция Т-лимфоцитов - эффекторные Т-лимфоциты (CD8-лимфоциты), которые осуществляют эффект иммунологической реакции чаще всего в форме цитолиза клеточных структур, к антигенам которых возникла иммунологическая реакция (Tsoumakidou M. et al., 2004). В нашем исследовании у больных ХОБЛ содержание CD-8 лимфоцитов достоверно высокое и не зависит от стадии заболевания. Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) у больных ХОБЛ составил 0.89 в стадии обострения и 1.15 при ремиссии заболевания, что достоверно ниже, чем в группе контроля (таблица 1).

Итак, у пациентов ХОБЛ наблюдается существенное увеличение содержания в крови цитотоксических лимфоцитов, что, по-видимому, является отражением чрезмерной стимуляции Т - клеточного звена иммунной системы у этих пациентов.

В качестве маркера НК- клеток использовали поверхностный рецептор CD 16, который отражает общее количество НК – клеток в крови, а о количестве активированных естественных киллерных клеток судят по экспрессии другого антигена – CD56 (Culley H.V., 2009).

Согласно полученным нами данным, у больных ХОБЛ в крови отмечалось выраженное повышение содержания естественных натуральных киллеров обеих субпопуляций лимфоцитов (таблица 1). Возможно, при ХОБЛ высокий процент содержания НК- клеток может быть косвенным подтверждением того, что в поддержании воспалительной реакции имеет значение инфекция дыхательных путей, т.к. получены данные, подтверждающие антимикробную функцию НК - клеток (Порядин Г.В, Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., 2002).

При изучении содержания естественных натуральных киллеров в крови больных БА было выявлено увеличение количества НК-клеток - CD56 в обе стадии заболевания (таблица 1). Количество CD16 – лимфоцитов у этих больных в стадии ремиссии не отличалось от группы контроля, но при обострении заболевания отмечалось их достоверное снижение.

По своим функциональным свойствам В-лимфоциты предназначены для реализации реакций гуморального иммунитета посредством выработки специфических антител. Среди наиболее важных маркеров, характеризующих В-клеточное звено, выделяют антигены CD20, CD72, mIgM и mIgG (Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., 2009, 2013).

CD 20 – антиген, который характеризует общее количество В-лимфоцитов. У больных ХОБЛ, согласно нашим данным, в период ремиссии общее количество В- лимфоцитов соответствует норме, однако в период обострения отмечается выраженная активация этих клеток (таблица 1). При этом почти в 2 раза увеличивается количество клеток, несущих мембранный гликопептид CD 72,

биологическая роль которого заключается в активации зрелых В-лимфоцитов и регуляции иммунного ответа (Ven Katamaran C. et al., 1998, Wu H.J. et al. 2001).

Отличительной особенностью созревающих и зрелых В-лимфоцитов является наличие поверхностных иммуноглобулиновых молекул, которые отсутствуют на других клетках иммунной системы (Wu H.J. et al., 2001). Основными изоформами мембранных иммуноглобулинов являются mIgM и mIgG. Существенное повышение содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные иммуноглобулины позволяет утверждать, что у больных ХОБЛ В-клеточная активация является отражением постоянно поддерживаемого процесса антигенной стимуляции с хроническим течением. Если учитывать данные, что увеличение В - лимфоцитов, особенно несущих mIgG, наблюдается при длительно персистирующих инфекциях, то это совершенно закономерно у пациентов ХОБЛ с частыми респираторными инфекциями (таблица 1).

Общее содержание В-лимфоцитов CD20, CD72 увеличивается у больных БА в стадию обострения более чем в 1,5 раза, а в стадию ремиссии практически не отличается от показателей группы контроля (таблица 1).

Анализ содержания в периферической крови зрелых В – клеток, несущих поверхностные иммуноглобулины М и G, показал их существенное увеличение, независимо от стадии БА, что позволяет говорить об активации В-клеточного звена иммунной системы в целом (таблица 1).

Количественный анализ иммунологических показателей не отражает в полном объеме механизмы вовлечения иммунной системы в патологический процесс при ХОБЛ и БА, в связи с чем мы дополнительно изучили изменения экспрессии активационных маркеров лимфоцитов, характеризующих функциональное состояние различных звеньев иммунной системы (Cloman H.V., James H.H., Maier T., 2006).

Для оценки активации В-клеток мы изучали экспрессию антигена CD23 – низкоаффинного рецептора для mIgE-маркера атопии. При ХОБЛ этот процесс выражен только в период обострения болезни (таблица 2). У больных БА, независимо от стадии заболевания, наблюдается достоверный прирост количества

активированных В - лимфоцитов (CD23) по сравнению с группой контроля (таблица 2).

Для оценки запуска активации и дифференцировки лимфоцитов используются маркеры ранней активации – CD 25 – рецептор для ИЛ-2, обеспечивающий быстрое размножение и последующую дифференцировку наивных Т-клеток до зрелых форм (Fu J., et al., 2014). Пролиферативную активность лимфоцитов мы оценивали по экспрессии рецепторов для трансферрина - CD 71, опосредующего включение ионов железа в клетки и регулирующего их рост и активацию (Порядин Г.В.,Салмаси Ж.М.,1997). В ряде исследований было показано, что при активации клеток экспрессия дифференцированных активационных антигенов, как правило, происходит в следующем порядке: CD25-CD71-CD54-HLA-DR-CD95. Следовательно, HLA-DR и CD95 можно рассматривать как поздние активационные маркеры лимфоцитов (Порядин Г.В. и др., 2013). Увеличение экспрессии HLA-DR-антигена свидетельствует о включении поздней стадии активации лимфоцитов (Порядин Г.В. и др., 2009).

При анализе содержания в крови больных лимфоцитов, экспрессирующих активационные антигены, было показано, что у больных ХОБЛ и БА наблюдается достоверное повышение содержания в крови CD25 и CD71 - лимфоцитов независимо от стадии заболевания (таблица 2). Из нашей работы следует, что у больных ХОБЛ и БА не отмечается нормализации вышеперечисленных иммунологических показателей даже вне обострения болезни, что свидетельствует об отсутствии достижения иммунологической ремиссии. В то же время содержание HLA-DR повышено более чем в 2 раза по сравнению с нормой, что может служить показателем недостаточного апоптоза при этих заболеваниях.

Дальнейшие исследования лимфоцитов с активационными антигенами состояли в оценке содержания лимфоцитов, экспрессирующих рецептор адгезии CD54 (ICAM-1), отражающий готовность клеток к миграции в очаг воспаления и их взаимодействия с антигенпрезентирующими клетками (Порядин Г.В. и др.,

1997, 2002). У больных БА, независимо от стадии заболевания, выявлено достоверное повышение уровня лимфоцитов, несущих рецепторы адгезии CD54 в периферической крови более чем в 2 раза. У больных ХОБЛ подобное повышение данного показателя значительно скромнее (таблица 2). Известно, что экспрессия ICAM - 1 усиливается под влиянием цитокинов IL-1, TNF- α , INF-g, IL-1, LPS, обладающих деструктивным действием на ткань бронхов и легких. Поэтому можно предположить, что повышение ICAM-1 у больных ХОБЛ и БА является одним из косвенных доказательств наличия персистирующего деструктивного процесса в легких и стенках бронхов (Порядин Г.В. и др., 2002, 2013, Распопина Н.А. и др., 2014).

При ряде иммунопатологических заболеваний описаны нарушения индукции активационного процесса, что, в свою очередь, сопровождается неуклонным прогрессированием воспаления (Порядин Г.В. и др., 1999). Для подтверждения этого положения было проведено исследование содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы индукции Fas-зависимого апоптоза (CD95) и лиганды к этому рецептору CD178 (Stalder T. et al., 1994).

Оценка состояния системы индукции Fas- зависимого апоптоза при БА позволила выявить, что у больных в стадию ремиссии содержание лимфоцитов, экспрессирующих Fas-антиген CD95 повышается по сравнению с группой контроля, тогда как в период обострения заболевания этот показатель остается низким (таблица 2).

У больных ХОБЛ содержание в крови CD95 –лимфоцитов в 3 с лишним раза превышало показатель контрольной группы, независимо от стадии заболевания. По-видимому, это связано с высокой концентрацией в крови больных ХОБЛ различных форм цитотоксических лимфоцитов, выделяющих медиаторы, индуцирующие процессы запуска апоптоза, в том числе экспрессию Fas (CD95) на поверхности клетки (Stalber T, et al., 1994).

При сравнении содержания в крови лимфоцитов, несущих на поверхности Fas-лиганд (CD178), было показано, что у больных БА содержание этих лимфоцитов существенно повышено, в то время как у больных ХОБЛ этот

показатель достоверно ниже, чем у здоровых людей (таблица 2). Как известно, величина экспрессии CD 95 – лимфоцитов отражает готовность лимфоцитов вступить в апоптоз, т.е. включить механизм программированной клеточной гибели по Fas – зависимому механизму (Титов Л.П., 2008, Порядин Г.В. и др., 2013). В результате исследования выявлено, что у больных ХОБЛ, независимо от периода болезни, высока готовность лимфоцитов к запуску активационного апоптоза (таблица 2). Однако торможение иммунного ответа путем удаления активизированных аутореактивных лимфоцитов возможно при взаимодействии Fas (CD95) и FasL (CD178) (Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., 2013). Согласно нашим данным, в период обострения ХОБЛ на фоне значительного увеличения Fas (CD95) - $15,04 \pm 1,06\%$ ($4,42 \pm 0,20\%$ в группе контроля) содержание FasL (CD178) не превышает $4,82 \pm 2,34\%$ ($9,22 \pm 1,04\%$ - контрольная группа), что может говорить о нарушении индукции апоптоза и поддержании персистирующего воспаления.

Для оценки иммунной системы приоритетное значение имеет не абсолютное количество лимфоцитов, экспрессирующих конкретные маркеры лимфоцитов, а изменение функциональной активности лимфоцитов, сопряженное с соотношением маркеров в популяции. В связи с этим была проведена оценка соотношения CD25/CD95 и HLA-DR/CD95 (Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Сычева О.В., 1999). Повышение CD25/CD95 у больных БА при обострении заболевания можно оценивать как преобладание активации лимфоцитов с последующей пролиферацией над их готовностью к вхождению в Fas-опосредованный апоптоз. В свою очередь, параллельное повышение соотношения HLA-DR/CD95 отражает преобладание процессов дифференцировки клеток над их элиминацией. Снижение этих показателей в период ремиссии свидетельствует о преобладании активационного апоптоза, приводящее к «торможению» иммунного ответа (Ярилин А.А., 2001). В данном случае мы наблюдаем преобладание процессов активационного апоптоза лимфоцитов (CD95) над их готовностью к дифференцировке у больных БА и приобретению позднего дифференцировочного

антигена (HLA-DR). По-видимому, вне обострения заболевания характерно формирование «иммунологической ремиссии».

У больных ХОБЛ, независимо от стадии заболевания, не наблюдается изменения соотношения CD25/CD95, а соотношение HLA-DR/CD95 было ниже, чем в группе контроля. Это, по-видимому, связано с высоким содержанием в крови больных ХОБЛ CD95 – лимфоцитов, что характерно для активации иммунной системы (Хаитов Р.М. и др., 2002).

При оценке полученных результатов необходимо учитывать, что развитие Fas-индуцированного апоптоза происходит только после взаимодействия Fas-антигена с Fas-лигандом (Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., 1997, Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., 2013). Поэтому, несмотря на более высокое содержание CD95 – лимфоцитов в крови больных ХОБЛ, по сравнению с обследованными больными БА, можно предположить, что для ХОБЛ характерен более низкий уровень апоптоза лимфоцитов, чем при БА, из-за низкого содержания лимфоцитов, экспрессирующих FasL (CD178) (Stalber T et al., 1994, Порядин Г.В. и др., 2013).

Анализируя полученные нами данные, мы смогли выделить иммунологические особенности для больных ХОБЛ и БА, что позволяет дифференцировать эти заболевания (таблица 3).

В настоящее время существенную роль в инициации и поддержании воспаления при ХОБЛ отводят курению (Smuth L.J. et al., 2011, Белевский А.С. и соавт., 2015). Сегодня стало очевидным, что при ХОБЛ воспалительный процесс не ограничивается только поражением легких, но и носит системный характер (Gan W.Q. et al., 2004, He Z. et al., 2010). Курение является самым распространенным и изученным фактором риска развития ХОБЛ, однако заболевание может развиваться и у некурящих лиц, что является причиной этого пока не совсем ясно (Белевский А.С., Визель А.А. и др., 2015).

Под наблюдением находились 50 больных ХОБЛ средней степени тяжести (согласно критериям GOLD 2016). 30 пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести имели индекс курения не менее 20 пачка\ лет и 20 больных, которые

никогда не курили. Возраст больных, составивших 1 группу (курящих) 50-62 г. (средний возраст $54,1 \pm 1,3$), 2 группы – 58-75 лет ($58,21 \pm 0,7$), а длительность анамнеза заболевания на момент осмотра составляла в первой группе $6,5 \pm 0,3$, а во второй - $3,4 \pm 0,8$.

В результате нашего исследования установлено, что изменения иммунологических показателей отмечены уже на ранних стадиях болезни, но достоверной разницы у обследуемых больных по полученным иммунологическим показателям не обнаружено.

Известно, что при ХОБЛ происходит нарушение баланса системы «оксиданты – антиоксиданты» в пользу первых, что ведет к развитию так называемого «оксидантного стресса» (Овчаренко С.А. и др., 2011, Шуганов А.Е., Палеев Ф.Н. и др., 2017). У всех обследуемых нами больных отмечено повышение первичных и вторичных продуктов пероксидации, и эти показатели были достоверно выше нормальных значений в обеих группах (таблица 4). Подобные изменения происходили на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной защиты клеток, что было статистически достоверно (таблица 4). Признаки наличия «оксидантного стресса», согласно нашим данным, были обнаружены в обеих группах больных ХОБЛ. Но при сравнении 2 – х групп пациентов видно, что более выраженные изменения ПОЛ наблюдались в группе курящих.

Подводя итог, можно утверждать: ХОБЛ – заболевание, в основе которого лежат совершенно различные, но чаще всего, взаимозависимые процессы. Выраженный «оксидантный стресс» на фоне иммунологических изменений у больных ХОБЛ, злоупотребляющих курением, приводит к раннему появлению и более тяжелому течению болезни, что отражается на длительности заболевания (у всех курящих пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести он был короче, а больные этой группы были моложе, чем в группе неподверженных табакокурению). Очевидно, что на ранних стадиях ХОБЛ одной из ведущих причин поддержания воспаления следует отводить «оксидантному стрессу» на фоне изменённых иммунологических показателей.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных БА и ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания, %.

Популяция лимфоцитов	Маркеры	Здоровые доноры	Больные БА (n=50)		
			в стадии обострения	в стадию ремиссии	в стадии обострения
Т-лимфоциты	CD3	65,20±0,66	56,64±1,72 ^{**}	50,52±1,02 [*]	61,65±2,95
	CD4	36,48±0,95	33,42±0,73 ^{**}	32,96±0,53 ^{***}	32,60±0,71 ^{***}
	CD8	25,90±0,50	20,69±0,73 [*]	18,81±0,27 [*]	36,23±2,54 [*]
NK – клетки	CD16	13,22±0,43	9,73±0,33 [*]	12,41±0,74	25,24±3,16 [*]
	CD56	4,47± 0,09	15,58±1,14 [*]	9,57±0,55 [*]	22,18±2,13 [*]

В-лимфоциты	CD20	10,15±0,16	17,44±0,64*	12,40±0,52	26,35±1,92**
	CD72	10,10±0,39	15,67±0,56*	10,18±0,35	18,15±2,34**
	mIgM	5,13±0,18	14,22±0,32*	8,89±0,26**	29,14±2,18*
	mIgG	6,54±0,48	14,17±0,31*	8,94±0,22***	21,65±1,15*

* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,05$ (по сравнению со здоровыми людьми).

Таблица 2.

Характеристика активационных маркеров лимфоцитов периферической крови больных БА и ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания %.

Маркеры	Здоровые доноры	Больные БА (n-50)		Больные ХОБЛ (n-50)
		В стадии обострения	В стадию ремиссии	В стадии обострения
CD23	5,29±0,30	13,26±0,36*	9,76±0,39***	17,85±2,53*
CD25	6,04±0,24	15,70±0,37*	11,83±0,26**	22,81±2,54*
CD71	6,32±0,21	13,11±0,77*	11,3±0,34**	22,95±2,26*
HLA-DR	11,83±0,30	23,85±0,65*	12,92±0,29	29,2±0,72*
CD54	5,55±0,33	27,92±1,55*	26,29±0,69*	15,91±2,79*
CD95	4,42±0,20	3,74±0,68	7,74±0,32**	15,04±1,06*
CD178	9,22±1,04	13,85±1,09**	10,1±1,2	4,82±2,34***

CD25/CD95	1,43±0,06	3,17±0,45**	1,20±0,08***	1,5±0,13
HLA-DR\CD95	3,04±0,33	5,23±0,64**	1,75±0,01**	1,95±0,14**

*p<0,001;**p<0,01;***p<0,05 (по сравнению со здоровыми людьми).

Таблица 3.

Значение поверхностных маркеров лимфоцитов у больных ХОБЛ и БА.

Заболевание	Поверхностные маркеры лимфоцитов			
	CD 8	CD 16	CD 178	CD 54
ХОБЛ				
БА				

Таблица 4.

Изменения показателей ПОЛ у больных ХОБЛ (группа 1- курящие и 2 группа – без употребления курения).

Показатели\норма	Норма	ХОБЛ 2 – 1 группа (30 больных)	ХОБЛ 2– 2группа (20 больных)
Гидроперекиси липидов (ГПЛ)	0,56 ± 0,03 отн. Ед\мл.эр.	1,0±0,007**	0,9±0,014*
Малоновый диальдегид(МДА)	1,138 ± 0,14 нмоль\10 ⁻⁶ эр.	1,4±0.1 **	1,2±0.09*
Супероксиддисмутаза (СОД)	1510 ±52.0 УД, акт\ г, НВ	1280±96**	1300±11.2*
Глютатионпероксидаза	0,06±0.005 ЕД,	0,04±0.0045**	0,06±0.003

(ГП)	акт\г НВ		
------	----------	--	--

** < 0,05 по сравнению с нормой; * < 0,05 по сравнению между группами

ВЫВОДЫ

1. У обследованных больных, независимо от стадии заболевания, отмечены существенные различия в иммунологических показателях; так, для ХОБЛ характерно достоверное повышение содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8), НК-клеток (CD16); При БА, напротив, отмечено снижение этих показателей.
2. У больных ХОБЛ и БА, независимо от стадии заболевания, определяется высокий уровень ранних активационных маркеров CD25, CD71 и рецептора адгезии CD54, что характерно для постоянной активации иммунной системы и сохранения воспалительного процесса в легких.
3. Повышенное содержание в крови лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные иммуноглобулины mIgM и mIgG, при ХОБЛ и БА, вне зависимости от стадии заболевания, свидетельствует о их постоянной В – клеточной активации.
4. У больных ХОБЛ, независимо от стадии заболевания, отмечается высокое содержание маркера Fas (CD95), но низкое содержание FasL (178), что свидетельствует о нарушении индукции апоптоза и поддержании персистирующего воспаления.
5. Курение инициирует «оксидантный стресс», что способствует более раннему проявлению и худшему течению заболевания у больных ХОБЛ уже на ранних стадиях заболевания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленные иммунологические различия между ХОБЛ и БА дают возможность более точной дифференциальной диагностики этих заболеваний.

2. В качестве дополнительного метода оценки активности воспалительного процесса при ХОБЛ следует определять следующие показатели: HLA-DR, CD23, CD25, CD71, CD20, CD72, mIgM, mIgG.
3. В качестве дополнительного метода оценки качества контроля за течением БА, наряду с клиническими симптомами, следует использовать показатели: HLA-DR, CD20, CD72, mIgM, mIgG для установления «иммунологической ремиссии» при этом заболевании.
4. В качестве алгоритма дифференциальной диагностики ХОБЛ и БА предложено исследование поверхностных маркеров лимфоцитов при этих заболеваниях.

На ранних стадиях ХОБЛ, наряду с бронходилататорами, следует использовать препараты, обладающие антиоксидантным действием.

Диагностический алгоритм при бронхообструктивном синдроме.

Симптомы:

кашель, одышка, приступы удушья, свистящие дыхание.

ЕСТЬ ИЗМЕНЕНИЯ	Рентгенография органов грудной клетки	НЕТ ИЗМЕНЕНИЙ		
Легочные заболевания:	Заболевания сердца:	Изменения	Спирометрия	Норма
-плевральный выпот.		Обструкция крупных дых.путей		Кашлевой в-т БА
-пневмоторакс.	ЭХО_КГ	Бронхоспазм		Гипервентиляционный с-м
-интерстициальные заболевания легких.		Рестриктивные заболевания		ТЭЛА
-эмфизема.		Проведение пробы с вентолином (400 мкг)		
-Хронический бронхит.		ПРИРОСТ <12%		ПРИРОСТ >12%
		(кашлевой в-т БА, ХОБЛ, дисфункция голосовых связок)		(БА,ХОБЛ,ХОБЛ+БА)

Проведение иммунологического теста

ХОБЛ (CD8 ↑,CD16↑, CD54↑,CD178 ↓,CD 95 ↑)

БА (CD8↓,CD16↓, CD 54 ↑↑,CD 178↑,CD 95↓)

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Шуганов А.Е.** Анализ активационного профиля лимфоцитов у больных ХОБЛ в период обострения и ремиссии/Зильбер И.Е.,Распопина Н.А., **Шуганов А.Е.**, Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н.// **Земский врач.** – 2012.- № 1 (11).-С. 67-69.
2. **Шуганов А.Е.** Особенности активационного профиля лимфоцитов у больных ХОБЛ/ Зильбер И.Е., Распопина Н.А., **Шуганов А.Е.**, Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н.// **Фарматека.**- 2012 .- № 1.-С. 7-10.
3. **Шуганов А.Е.** Роль цитотоксических лимфоцитов в воспалении у больных хронической обструктивной болезнью легких в стадиях обострения и ремиссии/Распопина Н.А., **Шуганов А.Е.**, Палеев Ф.Н., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н.// **Медицинский Альянс.** -2014.-№1.- С.37-41.
4. **Шуганов А.Е.** Место карбоцистеина в комплексной терапии у больных ХОБЛ/Шуганов Е.Г.,Шелест Е.А.,Гнеушева Т.Ю.,Салмаси Ж.М.,**Шуганов А.Е.** // **Земский врач.**-2014.-№1.-С.37-40.
5. **Шуганов А.Е.** Роль цитотоксических лимфоцитов в воспалении при хронической обструктивной болезнью легких в стадиях обострения и ремиссии/Распопина Н.А., **Шуганов А.Е.**, Палеев Ф.Н., Салмаси Ж.М.,Шуганов Е.Г.// **Альманах клинической медицины.**-2014.-№ 3(35).- С.49-53.
6. **Шуганов А.Е.** Клинико-иммунологические эффекты карбоцистеина при лечении больных ХОБЛ/ Салмаси Ж.М., Шуганов Е.Г., **Шуганов А.Е.**// **Альманах клинической медицины.** -2014-№3 (35).-С.66-71.
7. **Шуганов А.Е.** Особенности иммунного воспаления у больных с ХОБЛ и БА/Шуганов А.Е., Казимирский А.Н., Палеев Ф.Н., Распопина Н.А.,

Салмаси Ж.М.,Шуганов Е.Г.//**Архив внутренней медицины** -2015.- № 3 (23).-С. 56-72.

8. **Шуганов А.Е.** Эффективность терапии карбоцистеином в сочетании с бронхолитиками у больных ХОБЛ. **Шуганов А.Е., Шуганов Е.Г., Распопина Н.А.,Бирон М.Г.,Гнеушева Т.Ю.**// **Медицинский альянс**-2017.-№1.-С. 68-73.
9. **Шуганов А.Е.** Роль курения в патогенезе бронхиального и системного воспаления на начальном этапе ХОБЛ/ **Шуганов А.Е., Распопина Н.А., Салмаси Ж.М., Палеев Ф.Н., Шуганов Е.Г.**// **Архив внутренней медицины.** -2017- №2.-С.139-144.

В других изданиях:

10. **Шуганов А.Е.** К вопросу о патогенезе персистирующего воспаления при хронической болезни легких/ Распопина Н.А., Казимирский А.Н., **Шуганов А.Е.**// Материалы 10 международной научно-практической конференция «Стратегия лечения современной науки. - Польша. -2014- Т.26.
11. **Шуганов А.Е.** Тромбофилии и интенсивность внутрисосудистого микросвертывания крови у больных ХОБЛ, атеротромбозом/Шелест Е.А., **Шуганов А.Е.,** Патрушев Л.И., Бокарев И.Н.// Рациональная фармакотерапия в кардиологии. - 2014.-Т.10.№3.-С. 293-298.
12. Thrombophilia influence on the intensity of the intravascular microcoagulation at the patients with artherothrombosis and chronic obstructive pulmonary disease. Shelest E.A.,Matveeva M.A.,Popova L.V.,Patrushev L.I., **Shuganov A.E.**// Trombosis research-2014.-Vol.133.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CD3 – антигенспецифичекий Т-клеточный рецептор.

CD4/CD8 – иммунорегуляторный индекс.

CD 54 (ICAM-1), CD23, CD 95,(CD 178) – функциональные активационные маркеры лимфоцитов.

CD25,CD 71,HLA-DR, CD95 – активационные антигены

дифференцировочного характера.

Fas- лиганд, FasL – поверхностные рецепторы лимфоцитов.

NK – лимфоциты – «натуральные» киллерные клетки.

