

ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОКІНОВОГО БАЛАНСУ В ХВОРИХ НА СИСТЕМНУ СКЛЕРОДЕРМІЮ З ПОШКОДЖЕННЯМ ЛЕГЕНЬ

ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОКІНОВОГО БАЛАНСУ В ХВОРИХ НА СИСТЕМНУ СКЛЕРОДЕРМІЮ З ПОШКОДЖЕННЯМ ЛЕГЕНЬ – За останні роки вчені встановили, що найпоширенішим і найнебезпечнішим ускладненням системної склеродермії (ССД) є ураження легень, важливу роль у розвитку якого відіграють прозапальні та антизапальні цитокіни. Метою нашого дослідження було проаналізувати активність продукції цитокінів імункомпетентними клітинами у хворих на ССД з пошкодженням та без пошкодження легень (ПЛ). Було обстежено 74 хворих на ССД, з них 51 (71,8 %) з ПЛ і 23 хворих (28,2 %) без ПЛ за допомогою клінічних, рентгенологічних досліджень, імуноферментного та імунофлюоресцентного аналізів. Аналіз отриманих даних у хворих на ССД без ПЛ показав: підвищену активність Т-хелперів 2-го та 3-го типів з посиленою продукцією інтерлейкіну (IL4) та трансформуючого фактора росту- β (TGF- β) в сироватці крові. Хворі на ССД з ПЛ, порівняно з хворими на ССД без ПЛ, мають підвищення рівнів моноцитарно-хемокинового протеїну-1 (MCP-1) – у 2,1; TGF- β – у 1,8 рази, IL4 – у 2,0 рази, IL17 – у 2,7 рази, вмісту IL17 в Т-хелперах 17 типу – у 2,5 рази, а IL 4 – у 1,2 рази в цих же клітинах. Отже, підвищення рівня MCP-1, IL17 у сироватці крові та кількості позитивних Т-хелперів 17 типу є маркерами ризику раннього пошкодження легень у хворих на ССД.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО БАЛАНСА У БОЛЬНЫХ СИСТЕМОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ ЛЕГКИХ – За последние годы ученые установили, что самым распространенным и опасным осложнением системной склеродермии (ССД) является поражение легких, важную роль в развитии которого играют провоспалительные и противовоспалительные цитокины. Целью нашего исследования было проанализировать активность продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками у больных ССД с повреждением и без повреждения легких (ПЛ). Было обследовано 74 больных ССД, из них 51 (71,8 %) с ПЛ и 23 больных (28,2 %) без ПЛ с помощью клинических, рентгенологических исследований, иммуноферментного и иммунофлюоресцентного анализов. Анализ полученных данных у больных ССД без ПЛ показал: повышенную активность Т-хелперов 2-го и 3-го типов с усилением продукции интерлейкина (IL4) и трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) в сыворотке крови. Больные ССД с ПЛ, по сравнению с больными ССД без ПЛ, имели повышение уровня моноцитарно-хемокинового протеина-1 (MCP-1) – в 2,1, TGF- β – в 1,8 раз, IL4 – в 2,0 раз, IL17 – в 2,7 раз, содержания IL17 в Т-хелперах 17 типа – в 2,5 раз, а IL4 – в 1,2 раз в этих же клетках. Следовательно, повышение уровня MCP-1, IL17 в сыворотке крови и количества положительных Т-хелперов 17 типа являются маркерами риска раннего повреждения легких у больных ССД.

PECULIARITIES OF CYTOKINE BALANCE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA WITH LUNG INJURY – Nowadays, scientists have found that the most common and dangerous complication of systemic sclerosis (SSc) is a lung damage, an important role in the development of this complication play proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. The aim of our study was to analyze the activity of cytokine production by immunocompetent cells in patients with SSc with damage and without damage of the lungs (DL). We examined 74 patients with SSc, 51 (71.8 %) of whom with DL and 23 patients (28.2 %) without DL. We examined them through clinical and X-ray studies, ELISA and immunofluorescence analysis. Analysis of the results in patients with SSc without DL showed increased activity of T-helper 2-nd and 3-rd types with increased production interleukin (IL4)

and transforming growth factor- β (TGF- β) in serum. Patients with SSc with DL compared with patients with SSc without DL have increased levels of monocyte-chemokines protein-1 (MCP-1) – in 2.1 times, TGF- β – 1.8 times, IL4 – in 2.0 times, IL17 – 2.7 times, the content of IL17 in T-helper type 17 – in 2.5 times, and IL4 – 1.2 times in the same cells. Thus, increased MCP-1, IL17 in the serum and the number of positive T-helper type 17 are markers of the risk of early lung injury in patients with SSc.

Ключові слова: імунна відповідь, системна склеродермія, пошкодження легень.

Ключевые слова: иммунный ответ, системная склеродермия, повреждение легких.

Key words: immune response, system scleroderma, lung injury.

ВСТУП ССД входить до групи системних уражень сполучної тканини. Захворюваність на ССД, за даними американських авторів, становить 19,1 осіб на мільйон населення, а поширеність – 286 чоловік на мільйон [2, 4]. Європейські епідеміологічні дослідження представляють більш скромні результати: захворюваність – 3,7 на мільйон населення, поширеність – 30,8 випадків на мільйон населення. Летальність коливається від 1,4 до 5,3 випадків на мільйон населення та в основному зумовлена розвитком дихальної недостатності. Важливу роль у розвитку ССД та легеневих ускладнень відіграють імунологічні фактори, зокрема прозапальні та антизапальні цитокіни [3, 6].

Метою роботи було проаналізувати активність продукції цитокінів імункомпетентними клітинами в хворих на ССД з пошкодженням та без пошкодження легень.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Було обстежено 74 хворих на системну склеродермію (ССД), з них 21 хворий (друга група) без пошкодження легень, а 53 хворих (третя група) з пошкодженням легень (ПЛ). Також було обстежено 23 практично здорових осіб, які склали контрольну групу (перша група). Клінічне обстеження хворих на ССД включало характеристику шкірного синдрому, судинних проявів, ураження опорно-рухового апарату, патології внутрішніх органів, особливо органів дихання (рентгенологічні обстеження). Тяжкість периферичних і вісцеральних змін оцінювали за допомогою шкал, розроблених Т. А. Medsger та співавт. [7]. Діагноз виставляли на основі класифікаційних критеріїв, затверджених Європейською асоціацією ревматологів (2003). При дослідженні цитокінового балансу в даних хворих було застосовано наступні методи: імуноферментний та імунофлюоресцентний аналізи для оцінки рівня відповідних цитокінів та їх вмісту в Т-хелперних клітинах.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Проведені імунологічні дослідження хворих на ССД показали наступні особливості цитокінового балансу в обстежених осіб.

У таблиці 1 вказані рівні цитокінів у сироватці крові та CD4⁺-лімфоцитах в практично здорових осіб, хворих на ССД з ПЛ та без ПЛ.

Таблиця 1. Особливості цитокинового балансу в пацієнтів із системною склеродермією з пошкодженням легень та без пошкодження легень

Показник	Контроль (n=23)	ССД-ПЛ (n=21)	ССД+ПЛ (n=53)	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
	1	2	3			
MCP-1 pg/ml	94,9 ± 7,9	154,7 ± 26,2	303,4 ± 25,0	<0,05	<0,001	<0,01
IL12 pg/ml	51,0 ± 13,1	78,0 ± 19,0	87,7 ± 19,9	>0,05	>0,05	>0,05
TGF-β pg/ml	431,1 ± 37,65	532,3 ± 52,2	624,2 ± 30,9	<0,05	<0,05	<0,05
INF-γ pg/ml	11,2 ± 0,6	19,9 ± 6,8	31,0 ± 13,4	>0,05	>0,05	>0,05
CD4+INF-γ + %	20,6 ± 1,1	18,0 ± 5,5	29,0 ± 5,8	>0,05	>0,05	>0,05
IL4 pg/ml	1,09 ± 0,38	3,31 ± 1,5	6,71 ± 2,6	>0,05	<0,01	<0,05
CD4+IL4 + %	1,8 ± 0,7	3,7 ± 1,5	4,7 ± 1,4	<0,05	<0,01	>0,05
IL17 pg/ml	6,1 ± 0,7	7,0 ± 1,7	18,9 ± 2,3	>0,05	<0,001	<0,01
CD4+IL17+%	3,0 ± 0,3	3,6 ± 1,4	9,0 ± 2,9	>0,05	<0,01	<0,01
CD4+IL17+INF-γ + %	5,8 ± 0,4	5,4 ± 1,4	10,8 ± 3,1	>0,05	>0,05	>0,05, 0,05
CD4+IL17+IL4+%	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	>0,05	<0,05	>0,05

Як видно з таблиці, у хворих на ССД без ПЛ встановлено посилену продукцію мононуклеарно-фагоцитарними клітинами хемокінового протеїну-1 (MCP-1) до (154,7 ± 26,2) pg/ml, порівняно з практично здоровими особами – (94,8 ± 7,9) pg/ml ($p_{1,2} < 0,05$), особливо він зростає у хворих на ССД з ПЛ до (303,4 ± 25,0) pg/ml ($p_{1,3} < 0,001$) у 2,1 рази, що відрізняло цю групу від пацієнтів із ССД без ПЛ ($p_{2,3} < 0,01$). У хворих на ССД без ПЛ продукція Т-хелперами 3-го типу TGF-β, який має важливе значення у фібротично-склеротичних процесах [8] шкіри та вісцеральних органів, здійснювалась посилено. Рівень цього цитокину був високим – (532,3 ± 52,2) pg/ml, порівняно зі здоровими обстеженими – (431,1 ± 37,7) pg/ml ($p_{1,2} < 0,05$) і збільшувався в групі хворих на ССД з ПЛ – (624,2 ± 30,9) pg/ml ($p_{1,3} < 0,05$), що теж відрізняло їх від хворих на ССД без ПЛ ($p_{2,3} < 0,05$). Пацієнти із ССД з ПЛ та без ПЛД мали тенденцію до посилення продукції INF-γ у сироватці крові й більш активне накопичення в Т-хелперах 1-го типу, але без вірогідності, що зумовлене, ймовірно, невисокою продукцією IL12 антигенпрезентуючими клітинами. Разом з тим, Т-хелперні клітини 2-го типу мали характерне накопичення IL4 до (3,7 ± 1,5) % в групі хворих на ССД без ПЛ ($p_{1,2} < 0,05$), що зумовлювало тенденцію до підвищеного рівня цього цитокину в сироватці крові хворих – до (3,31 ± 1,5) pg/ml ($p_{1,2} > 0,05$), але особливо виражені зміни цього цитокину були в пацієнтів із ССД з ПЛ: в клітинах – до (4,7 ± 1,4) % ($p_{1,3} < 0,01$) та в сироватці крові – до (6,71 ± 2,6) pg/ml ($p_{1,3} < 0,01$), порівняно з контрольною групою: в клітинах – (1,8 ± 0,7) %, у сироватці крові – (1,09 ± 0,38) pg/ml. Важливо зазначити, що рівень IL4 в сироватці крові у пацієнтів із ССД з ПЛ був підвищений у 2,2 рази порівняно з хворими на ССД без ПЛ ($p_{2,3} < 0,01$). Було встановлено у третій групі хворих також значне наростання рівня IL17 у сироватці крові (18,9 ± 2,3) pg/ml в 3,1 рази, порівняно зі здоровими обстеженими ((6,1 ± 0,7) pg/ml, $p_{1,3} < 0,001$) та у 2,7 рази порівняно з хворими другої групи (7,0 ± 1,7) pg/ml, $p_{2,3} < 0,01$). Ці особливості відповідали збільшенню кількості ізольованих Т-хелперів 17 (9,0 ± 2,9) % у хворих на ССД з ПЛ в 3,0 рази ($p_{1,3} < 0,001$), порівняно з здоровими, та в 2,5 рази, порівняно з хворими на ССД без ПЛ ($p_{2,3} < 0,01$), а з подвійним внутрішньоклітинним маркуванням по цитокинах CD4+IL17+IL4+ (1,8 ± 0,2) % теж наростання кількості

у 1,9 рази порівняно зі здоровими ((1,0 ± 0,2) %, $p_{1,3} < 0,05$). Якщо порівняти групи хворих на ССД з ПЛ та без ПЛ, то можна встановити наступні закономірності за синтезом цитокинів, так, у хворих на ССД з ПЛ встановлено більш активний синтез та відповідно рівень в сироватці крові: MCP-1 – у 2,1, TGF-β – у 1,8 рази ($p < 0,01$), IL4 – у 2,0 рази, IL17 – у 2,7 рази та його вмісту в CD4+ клітинах – у 2,5 рази, а також CD4+IL17+IL4+ – у 1,2 рази.

Проведений кореляційний багатофакторний аналіз цитокинових факторів ризику пошкодження легень показав, що рівні MCP-1 та інтерлейкіну-17 (IL17) в сироватці крові, а також кількість CD4+IL17+лімфоцитів є основним предикторами раннього пошкодження легень у хворих на ССД. Кореляцію таких закономірностей показано на рисунку 1.

У хворих на ССД імунокомпетентні клітини активно продукують фактори, що впливають на фібротичні процеси сполучної тканини: TGF-β [8], IL4 [5]. В обстежених хворих на ССД ми виявили виражену активацію хелперів 2-го, 3-го типів з підвищеною продукцією саме цих цитокинів, які підтверджує дослідженнями ряд вчених [9]. Проведене дослідження показало підвищення рівня TGF-β в сироватці крові хворих на

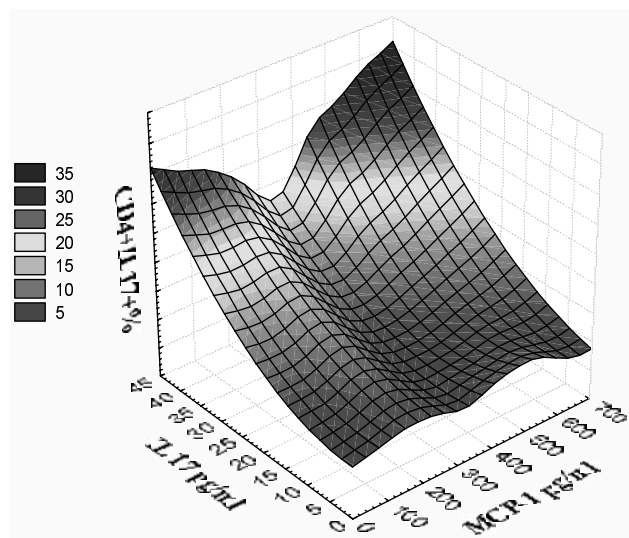


Рис. 1. Мультифакторний аналіз цитокинового ризику розвитку пошкодження легень у хворих на ССД.

ССД без ПЛ з початковою стадією пневмофіброзу, разом з тим, інші вчені [11] стверджують, що вірогідне збільшення TGF- β встановлене лише в середньотяжкій та тяжкій стадіях фіброзу. Хоча варто зазначити, що цей показник не є критерійним для хворих на ССД з ПЛ ($r=0,32$). Як відомо, IL4 є не тільки цитокином, що впливає на активність антитілогенезу загалом, розвиток реактивного механізму в формуванні імунного запалення, відомий його вплив на підвищення синтезу колагену та розвиток фібротичних процесів, зокрема при ССД [12]. У досліджуваних осіб встановлено значний приріст рівня IL4 в сироватці крові, а також накопичення його у відповідних Т-хелперах 2-го типу, що створює резерв для подальших фібротичних змін у легенях. Крім того, в даних хворих встановлено також вірогідне підвищення кількості комбінованих хелперних субпопуляцій, що містять IL4 та IL17, які створюють ризик більш активного під'єднання імунного запалення судин, що може призводити до розвитку раннього легеневого васкуліту.

У хворих на ССД з ПЛ виявлено, крім активації хелперів 2-го, 3-го типів, ще і посилену функціональну здатність Т-хелперів 17-го типу з можливим як фібротичним, так і судинним пошкодженням легень. Цікаво зазначити, що в досліджуваних хворих на ССД без ПЛ рівень IL17 в крові мав лише тенденцію до підвищення, а в групі ССД з ПЛ був вірогідно вищим порівняно як з контрольною, так і з групою ССД без ПЛ. У досліджуваних хворих також спостерігали збільшення кількості CD4+IL17+ -лімфоцитів у хворих на ССД з ПЛ, що відповідало даним цих досліджень. Ці дані вказують на значну роль цього цитокіну при пошкодженні легень із ризиком розвитку раннього пневмофіброзу та ендотеліальної дисфункції легеневої судин і формування васкуліту, що співзвучно з дослідженнями провідних вчених [9].

Активний біомаркер запуску цитокинової прозапальної здатності імунотропних клітин є хемотаксичний моноцитарний протеїн-1 або β -хемокін класу СС ліганд 2 (CCL2), який визначає міграційну активність моноцитів/макрофагів і значною мірою може впливати на запуск імунозалежних запальних процесів [12]. Ми встановили, що цей фактор більш активно продукується клітинами у хворих на ССД не залежно від пошкодження легень, але рівень його значно вищий у пацієнтів із ССД та ПЛ. Це свідчить про певні асоціації продукції цього цитокіну з активністю імунного запалення, яке може впливати на формування легеневої ускладненості ССД, зокрема пневмофіброзу та легеневого васкуліту [10].

Проведений багатофакторний кореляційний аналіз цитокинового профілю у хворих на ССД з ПЛ та без ПЛ, що найбільш значущими імунозалежними цитокиновими факторами ризику розвитку пошкодження легень при ССД є: підвищення рівнів у сироватці крові MCP-1 та IL17, а також збільшення кількості CD4+IL17+ лімфоцитів.

ВИСНОВКИ 1. У хворих на ССД без ПЛ встановлено підвищену активність Т-хелперів 2-го та 3-го типів з підвищеною продукцією IL4 та TGF- β , а при ПЛ ще і Т-хелперів 17-го типу з підвищенням синтезу IL17 та додатково і IL4 через збільшення кількості CD4+IL17+IL4+ -лімфоцитів.

2. Хворі на ССД з ПЛ порівняно з пацієнтами із ССД без ПЛ мають підвищення цитокинового профілю за наступними показниками: MCP-1 – у 2,1, TGF- β – у 1,8 рази, IL4 – у 2,0 рази, IL17 – у 2,7 рази, вміст IL17 в CD4+ клітинах – у 2,5 рази, а також IL4 у CD4+IL17+ IL4+лімфоцитах – у 1,2 рази.

3. Підвищення рівня MCP-1, IL17 у сироватці крові та кількості позитивних CD4+IL17+лімфоцитів є маркерами ризику раннього пошкодження легень у хворих на ССД.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баткаев Э. А. Склеродермия : учебн. пособ. Российская медицинская академия последипломного образования / Э. А. Баткаев, Ю. А. Галямова. – М. : Медицина. – 2007. – 321 с.
2. Надашкевич О. Н. До питання імунологічного статусу при системній склеродермії / О. Н. Надашкевич // Львівський медичний часопис. – 2009. – № 1. – С. 17–18.
3. Яцишин Р. І. Системна склеродермія. Особливості патогенезу та імунної регуляції захворювання / Р. І. Яцишин // Укр. ревмат. журнал. – 2009. – № 8. – С. 17–20.
4. Frech T. Prevalence and correlates of sleep disturbance in systemic sclerosis-results from the UCLA scleroderma quality of life study / T. Frech, R. D. Hays, P. Maranian // Rheumatology (Oxford). – 2011. – № 1. – P. 12–16.
5. Furuzawa-Carballeda J. Subcutaneous administration of polymerized type I collagen downregulates interleukin (IL)-17A, IL-22 and transforming growth factor- β 1 expression, and increases Foxp3-expressing cells in localized scleroderma / M. Ortiz-Avalos, G. Lima, F. Jurado-Santa Cruz, L. Llorente // Clin. Exp. Dermatol. – 2012. – № 37. – P. 599–609.
6. LeRoy E.G. A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis) / E. G. LeRoy // Ann. Rheum. Dis. – 1992. – Vol. 51. – P. 286–288.
7. Medsger T. A. Survival in systemic sclerosis (scleroderma) / T. A. Medsger, A. T. Masi, G. P. Rodnan [et al.] // Ann. Intern. Med. – № 75. – 1971. – P. 369–376.
8. Sargent J. A TGF β -responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma with increased disease severity // J. Sargent, A. Milano, S. Bhattacharyya [et al.] / J. Invest. Dermatol. – 2010. – № 130. – P. 694–705.
9. Shilling R. Role of Th17 cells and IL-17 in lung transplant rejection/ R. Shilling, D. Wilkes // Immunopathol. – 2011. – № 2. – P. 35–40.
10. Steen V. D. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma / V. D. Steen, T. A. Medsger // Arthritis Rheum. – 2000. – Vol. 43. – P. 2437–2444.
11. Yoshizaki A. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model / A. Yoshizaki, K. Yanaba, Y. Iwata [et al.] // J. Immunol. – 2010. – № 185. – P. 2502–2515.
12. MCP-1–2518 A/G Single Nucleotide Polymorphism in Slovak Patients with Systemic Sclerosis / Zdenka Navratilova, Jozef Lukac, Frantisek Mrazek, Eva Kriegova // Mediators Inflamm. – 2008. – Published online 2008 June 2.

Отримано 11.02.13