

На правах рукописи

КОЗЫРЕВА ЛИЛИЯ СЕРГЕЕВНА

**ЗНАЧЕНИЕ ИММУННЫХ ПРЕДИКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ
ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ**

14.01.04 – внутренние болезни

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Уфа-2010

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию и государственном учреждении здравоохранения Республиканская клиническая больница им.Г.Г.Куватова

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Никуличева Валентина Ивановна
доктор медицинских наук

Азнабаева Лилия Фаритовна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Фазлыева Раиса Мугатасимовна
доктор медицинских наук, профессор
Хайруллина Раиса Мазгутовна

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет»

Защита состоится 21 декабря 2010г. в 11 часов на заседании диссертационного Совета Д.208.006.03 государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию по адресу: 450000, г. Уфа, ул. Ленина,3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.

Автореферат разослан 20 ноября 2010 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Мирсаева Г.Х.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема внебольничных пневмоний (ВП) является одной из актуальных в современной медицине. Заболеваемость внебольничной пневмонией за последние 30 лет увеличилась в 3 раза (с 5 до 15‰), а общее число больных ежегодно превышает 1,5 млн. человек [Чучалин А.Г., 2010].

Пневмония занимает шестое место в перечне главных причин смерти в большинстве стран. В России ежегодно от данного заболевания умирает около 45 тыс. человек (31 случай на 100 тысяч населения). Анализ российских данных в отдельных регионах свидетельствует, что наиболее высокая смертность от ВП регистрируется у мужчин трудоспособного возраста [Чучалин А.Г., 2010].

К особенностям современного течения внебольничной пневмонии относятся расширение спектра потенциальных возбудителей, в том числе атипичных (*Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp.) и нетипируемых гемофильных палочек (*Haemophilus influenzae*) [Караулов А.В., 2002, Новиков Ю.К., 2006], наличие смешанных или микст-инфекций, результатом которых является воздействие на организм двух или более возбудителей вирусной, бактериальной или иной атипичной этиологии [Зубков М.Н., 2005; Щерба Ю.В., 2005; Ноников В. Е., 2005; Тартаковский И.С., 2009; BTS, 2004].

За последние годы увеличилось количество нетипичных форм заболевания, которые по данным литературы составляют от 12 до 40% всех случаев на фоне накопленного значительного объема научных методов диагностики и лечения внебольничной пневмонии. Одной из ведущих причин тяжелого и нетипичного течения пневмонии в настоящее время считается изменение иммунологической реактивности макроорганизма [Карпищенко А.И., 2001, Романцов М.Г. и др., 2005].

На современном этапе понимания патогенеза ВП, состояние иммунитета и значение иммунных нарушений в клинике, диагностике и прогнозировании течения заболевания полностью не решены. Широко применяются

различные иммуномодуляторы (полиоксидоний, иммунофан, ликопид, деринат, Ронколейкин®). Однако остается неизученной система иммунных предикторов разного уровня: неспецифического (роль фагоцитов), гуморального, клеточного, медиаторного и цитокинового звеньев и их симбиотическая роль в формировании нетипичного течения внебольничной пневмонии.

Цель работы: Оценка особенностей внебольничной пневмонии и разработка критериев раннего прогнозирования нетипичного течения заболевания на основе изучения клинико-функциональных, гендерных, иммунологических и иммуногенетических факторов.

Задачи исследования:

1. Проанализировать особенности клинического течения внебольничной пневмонии с учетом возраста, пола, сопутствующих заболеваний, курения и обосновать их диагностическую значимость;

2. Изучить микробный пейзаж возбудителей внебольничной пневмонии культуральным методом, ДНК возбудителей (вирусы семейства Herpesviridae, хламидии, микоплазмы) методом полимеразно-цепной реакции в бронхо-альвеолярной лаважной жидкости и содержание антител к ним в крови (IgG, IgA и IgM) методом иммуноферментного анализа, и обосновать их значение при внебольничной пневмонии;

3. Провести комплексную оценку особенностей иммунного реагирования у больных с различными формами внебольничной пневмонии путем изучения показателей общего анализа крови, иммунограммы;

4. Исследовать продукцию хемокина интерлейкина-8 (IL-8) по данным содержания цитокина в сыворотке, цитокинпродуцирующей способности клеток крови в зависимости от иммуногенетических особенностей – полиморфизма гена IL-8 в локусе 251 Т/А и обосновать их прогностическую значимость у больных внебольничной пневмонией;

5. Определить особенности гормонального реагирования у больных с различным течением внебольничной пневмонии по данным содержания в

крови кортизола, тестостерона, пролактина и изучить их влияние на иммунную систему при внебольничной пневмонии;

б. На основе полученных данных разработать и предложить критерии раннего прогнозирования нетипичного течения внебольничной пневмонии.

Научная новизна

Установлено влияние возбудителей оппортунистических инфекций (вирусы семейства *Herpesviridae* и/или хламидии и микоплазмы) на развитие нетипичного («не отвечающего» на антибактериальную терапию) течения внебольничной пневмонии. Выявление антител острого периода к вирусам семейства *Herpesviridae* повышает риск развития нетипичного течения в 2 раза. Дана комплексная оценка иммунного реагирования у больных с различным течением внебольничной пневмонии (с адекватным ответом, «не отвечающая» на лечение, затяжная). Для всех форм заболевания характерно формирование иммунного ответа по гуморальному пути (Th-2) с подавлением клеточного (Th-1). Адекватный ответ характеризуется активацией элиминационных факторов иммунной системы (фагоцитарная, комплементарная системы) и IL-8 продуцирующей способности клеток крови. «Не отвечающая» на лечение пневмония развивается на фоне недостаточности факторов 1-ой линии защиты – фагоцитарной системы, комплементарной активности и НК-клеток и продукции IL-8. Установлено, что нетипичное течение внебольничной пневмонии («не отвечающая» и затяжная) ассоциируется с недостаточностью IL-8. У больных с «не отвечающей» на лечение пневмонией выявлена ассоциация недостаточной продукции IL-8 с генотипом AA полиморфного локуса 251 Т/А гена IL-8. Выявлено, что сочетание недостаточности продукции IL-8 и низкого уровня НК-клеток является неблагоприятным маркером в отношении раннего прогноза развития нетипичного течения у больных с тяжелой формой внебольничной пневмонии и повышает риск развития в 13,5 раз. Определено влияние особенностей гормонального реагирования на исход внебольничной пневмонии. Адекватный ответ сопровождается недостаточностью тестостерона у мужчин, у женщин – повышенной

продукцией пролактина. «Не отвечающая» на лечение пневмония характеризуется повышенной продукцией кортизола, высоким уровнем пролактина у женщин и выраженной недостаточностью тестостерона у мужчин. Воздействие гормонов характеризовалось иммуносупрессивным влиянием на IL-8 продуцирующую способность клеток крови.

Практическая значимость работы

Разработаны критерии раннего прогнозирования нетипичного течения внебольничной пневмонии: недостаточность продукции IL-8 в сыворотке крови (менее 80 пг/мл), низкое содержание NK-клеток (менее 10%), гомозиготный генотип AA в полиморфном локусе 251 T/A гена IL-8, ареактивность метаболической активности фагоцитов, несостоятельность T-клеточного звена, активация возбудителей оппортунистических инфекций. Приведенные критерии позволяют диагностировать и прогнозировать нетипичное течение внебольничной пневмонии и провести своевременную и адекватную терапию.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Внебольничная пневмония развивается на фоне ассоциированной инфекции – активации бактериальной флоры (грамположительные возбудители 44% и грамотрицательные возбудители, грибы – 56%), возбудителей оппортунистических инфекций – вирусов семейства Herpesviridae в сочетании с хламидиями и/или микоплазмами.

2. В иммунопатогенезе внебольничной пневмонии лежит формирование иммунного реагирования по гуморальному пути (Th-2) с угнетением клеточного (Th-1 путь). Типичное течение реализуется активацией продукции антител и элиминационных факторов – фагоцитарной и комплементарной систем. «Не отвечающая» на лечение пневмония характеризуется активацией антительной защиты на фоне несостоятельности факторов 1-ой линии защиты: элиминационных возможностей (фагоцитов и комплемента) и недостаточностью NK-клеток.

3. Несостоятельность фагоцитарного звена ассоциирована с генетически обусловленной недостаточностью IL-8 (наличием генотипа AA в полиморфном локусе 251 T/A гена IL-8).

Внедрение результатов исследования в практику. Разработанные иммунологические критерии используются у больных внебольничной пневмонией для раннего прогнозирования нетипичного течения заболевания в пульмонологическом отделении ГУЗ РКБ им.Г.Г.Куватова г.Уфы. Основные положения диссертации вошли в программу лекционного курса кафедры терапии и общей врачебной практики с курсом гериатрии и подготовки интернов терапевтического профиля Института последипломного образования Башкирского государственного медицинского университета.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на Конференции по проблемам пожилого человека «Терапевтические проблемы пожилого человека» (Санкт-Петербург, 2009), научной конференции с международным участием «Современные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Таиланд, 2010).

Апробация диссертации проведена на совместном межкафедральном заседании кафедр терапии и проблемной комиссии по внутренним болезням (протокол №5 от 03.11.10г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК РФ – 3. Получено положительное решение о выдаче патента РФ на изобретение (№ 2009120971/15(028977) заявка от 02.06.09г.).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 155 страницах, состоит из введения, обзора литературы, раздела собственных исследований (главы), заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы содержит 218 источников (131 отечественных и 87 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего под наблюдением находились 120 пациентов с различными формами внебольничной пневмонии в возрасте от 16 до 80 лет в пульмонологическом отделении Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова (г.Уфа). Из них мужчин было 100 чел.(83,3%), женщин – 20 чел. (16,7%). Средний возраст пациентов составил $42,0 \pm 1,5$ года. Контрольную группу (ПЗЛ) составили практически здоровые лица, сопоставимые по возрасту ($38,2 \pm 3,1$ лет) и полу с группой больных внебольничной пневмонией – 82 человека.

В зависимости от характера течения пневмонии исследуемые были разделены на 2 группы в соответствии с отечественными рекомендациями [Чучалин А.Г., Синопальников А.И.,2010]: 1-я группа – острая внебольничная пневмония – 92 больных (77 %); 2-я группа – затяжная пневмония (ЗП) – 28 больных (23%). Среди больных 1-ой группы в зависимости от исхода воспалительного процесса были выделены 2 подгруппы (согласно рекомендациям Синопальникова А.И.): 1-я подгруппа – больные острой ВП с адекватным ответом на проводимую терапию (за период лечения в стационаре (21 день)) наступило клиническое и рентгенологическое выздоровление – 60 больных (50%); 2-я подгруппа – больные острой ВП, у которых на момент выписки из стационара сохранялись рентгенологические и клинические признаки неразрешившегося воспалительного процесса («не отвечающая» на лечение пневмония) – 32 больных (27%).

Диагноз устанавливали на основании жалоб, анамнеза, клинической картины, данных лабораторных и инструментальных исследований. Всем больным проводились общеклинические методы исследования крови, мочи, мокроты, ЭКГ, спирография, рентгенография ОГК, компьютерная томография высокого разрешения, фибробронхоскопия),

Бактериальное исследование мокроты для выявления возбудителей проводили культуральным методом (Богданович Т.М. с соавт., 2000). Брон-

хоальвеолярную жидкость, полученную при фибробронхоскопии, исследовали на ДНК и РНК вирусов семейства Herpesviridae (Cytomegalovirus, Herpes simplex virus 1, II, Epstein-Barre virus) и атипичных возбудителей (Mycoplasmae pneumoniae, Chlamydothylae pneumoniae) молекулярно-биологическим методом (методом ПЦР с детекцией флюоресценции в режиме реального времени – real time PCR) («Митех», Москва). Одновременно к данным возбудителям оценивали в сыворотке крови специфические иммуноглобулины А, М и G (IgA, IgM, IgG) методом ИФА («Вектор-Бест», пос. Кольцово, Новосибирская обл.).

Состояние иммунной системы оценивалось однократно до лечения путем изучения лейкограммы венозной крови [Меньшиков В.В., 1987]; исследования фагоцитарной активности нейтрофилов по отношению к частицам латекса с подсчетом фагоцитарного числа и индекса [Шишкин В.Л., 1987]; НСТ-теста – восстановления нейтрофилами нитросинего тетразолия, с подсчетом НСТ-показателя и индекса активации [Нагоев Б.С., 1983; Лебедев К.А. и др., 1990]; идентификации популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+CD56+, CD20+, HLA-DR) с помощью моноклональных антител (производство Beckman Coulter, Франция) с использованием проточного цитофлюориметра Cytomics FC 500 (производство Beckman Coulter, Франция); количественного определения иммуноглобулинов классов А, М и G (IgG, IgA, IgM) методом радиальной иммунодиффузии в геле [Manchini J. et al., 1965]; определения концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом преципитации с 3,75% раствором полиэтиленгликоля (мол. м. 6000 Д) [Гудина Р.В., 1988]; изучения функциональной активности Т-лимфоцитов с использованием реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) (тест-системы МигРоСкрин (СП Ниармедик, Москва); исследования цитокинпродуцирующей способности клеток цельной крови (IL-8) - уровень IL-8 в сыворотке крови и надосадочной жидкости культуральных образцов, показатели спонтанной и стимулированной фитогемагглютинином (ФГА) продукции хемокина методом иммуно-

ферментного анализа однократно, с использованием стандартных тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (пос. Кольцово, Новосибирская обл.).

Молекулярно-генетическое исследование с целью определения полиморфизма гена IL-8 в промотерной части (локус 251 T/A) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК на термоциклере «Терцик» производства компании «ДНК-технология» (г. Москва) в автоматическом режиме. Полиморфизм локусов генов IL-8 исследовался методом ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Исследование гормонального фона проводилось путем определения кортизола у всех больных, пролактина у женщин и тестостерона у мужчин методом ИФА с использованием стандартных тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (пос. Кольцово, Новосибирская обл.).

Все функциональные и лабораторные исследования, проведены на базе ГУЗ РКБ им.Г.Г.Куватова в соответствующих отделениях.

Статистическая обработка полученных данных проводилась стандартными методами медико-биологической статистики с использованием пакета SPSS 11, пакета прикладных программ «Statistic for Windows 5.0» (StatSoft), программного обеспечения MS Excel 2003 (Microsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка возрастных и гендерных особенностей в зависимости от течения пневмонии показала, что в основном, пневмонией болели лица трудоспособного возраста от 16 до 60 лет, что составило 85% от всех больных, среди больных трудоспособного возраста наибольшее количество – это люди до 30 лет – 26%.

Анализ распределения больных по возрасту в зависимости от течения заболевания показал, что с возрастом увеличивается доля с нетипичным течением ВП – «не отвечающая» на лечение пневмония резко увеличивается в возрастной категории 40-49 лет (с 16-18% до 48%). Отмечается четкая тенденция к увеличению количества затяжных пневмоний (от 0% в возрасте 16-29 лет до 42% в возрасте 50-59 лет) (рис.1).

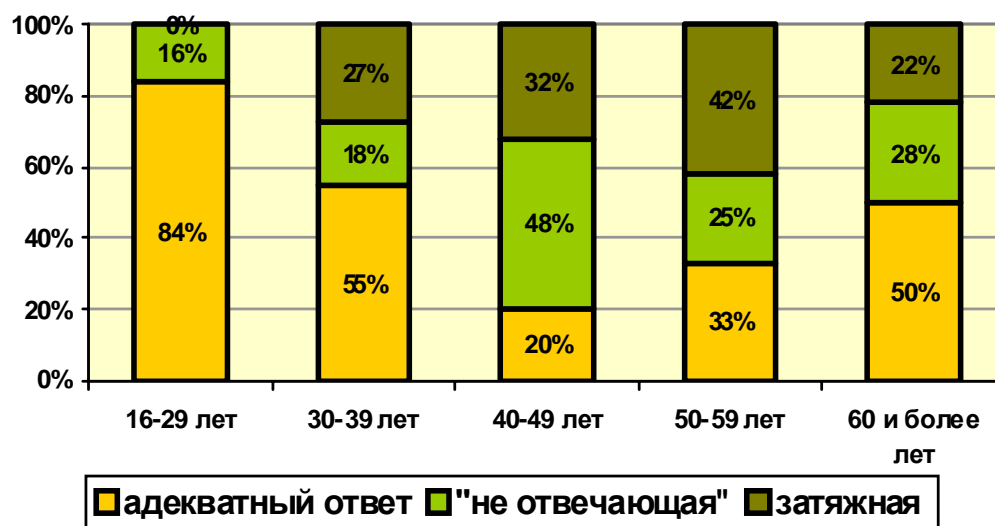


Рис.1. Распределение больных внебольничной пневмонией по возрасту в зависимости от течения заболевания

Оценка характера течения внебольничной пневмонии в зависимости от объема поражения показала, что преимущественно отмечалась пневмония с поражением одной доли легкого (рис.2).

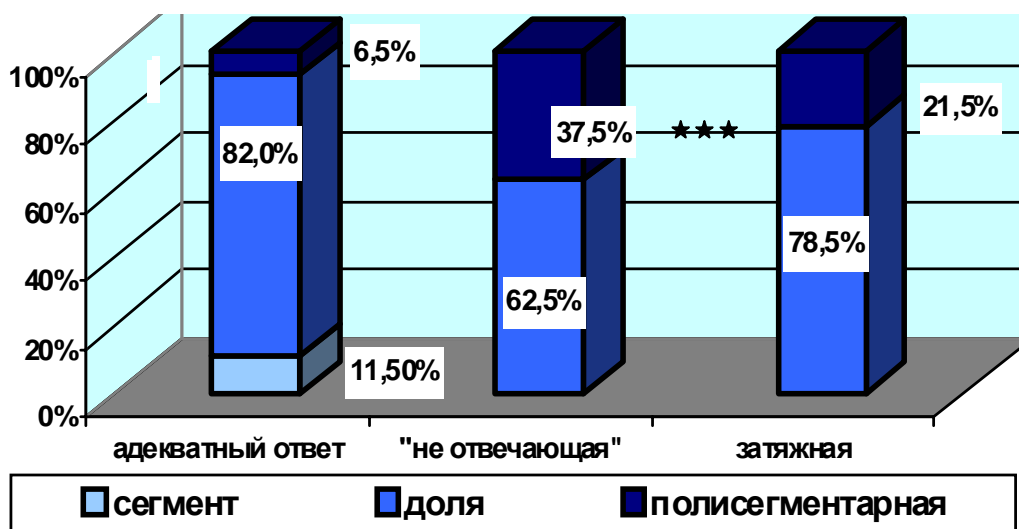


Рис.2. Объемность поражения легких у больных внебольничной пневмонией в зависимости от характера течения заболевания (%). Примечание:

★★★ - отличие данных от показателей в группе контроля с $p < 0,001$

В то же время, имело место более обширное поражение легких при нетипичном течении заболевания. Так, полисегментарное поражение выявлялось чаще, чем при адекватной ВП и составило при «не отвечающей» форме заболевания 37,5% против 6,5% ($\chi^2 = 11,7$, $p = 0,001$, $OR = 8,4$), а сегментарное воспаление практически не выявлялось (0% против 11,5%) (рис. 2). Уста-

новлено, что поражение легких более одной доли повышает риск нетипичного исхода пневмонии в 8,4 раза.

Анализ симптомов пневмонии показал, что у больных «не отвечающей» формой заболевания была более выражена высоко-лихорадочная температурная реакция (64% против 32%, $p < 0,01$), инфекционно-токсический шок (28,1% против 8,3%, $p < 0,05$), интоксикация (78,1% против 31,7%, $p < 0,001$). При затяжном течении пневмонии достоверно чаще встречался плеврит (37,5% против 15%, $p < 0,05$). Таким образом, при «не отвечающей» пневмонии чаще встречалась тяжелая форма заболевания.

Оценка влияния гендерных различий, сопутствующей патологии (ХОБЛ) и табакокурения не выявила особенностей в течении заболевания.

Анализ микробного спектра возбудителей в мокроте больных ВП показал преобладание грамположительной флоры, которая выявлялась в 64% случаев наблюдения, у 36% были обнаружены грамотрицательные микроорганизмы. Грамположительная флора представлена *Streptococcus pneumoniae* в 44%, *Staphylococcus aureus* – 20%. В числе грамотрицательных патогенов были выделены *Klebsiella pneumoniae* 12%, *Haemophilus influenzae* 6%, *Pseudomonas aeruginosa* 6%, *Neisseria spp.* 6%, *Enterobacter aerogenes* 6%.

Анализ бронхоальвеолярной жидкости методом ПЦР показал, что в 35% случаев выявлялись возбудители – *Herpes simplex virus*, *Cytomegalovirus*, *Mycoplasma pneumoniae*. Среди выявленных возбудителей абсолютное большинство составляли вирусы семейства *Herpesviridae* – *Herpes simplex virus* и *Cytomegalovirus* (25%); на втором месте по выявляемости были *Mycoplasma pneumoniae* (10%). Связи с течением заболевания не было выявлено.

Результаты проведенной серодиагностики свидетельствовали, что у больных внебольничной пневмонией диагностически значимые антитела к оппортунистическим инфекциям (вирусам семейства *Herpesviridae*, хламидиям, микоплазмам) выявлялись в 2 раза чаще по сравнению с группой ПЗЛ (78% против 42,9%; $\chi^2 = 6,95$; $p = 0,009$; $OR = 4,7$) (рис.3). За диагностически значимые принимали Ig М к *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex virus 1,II*; Ig

М и Ig G-ЕА к Epstein-Barre virus и Ig A, М, G к Mycoplasmae pneumoniae и Chlamydo philae pneumoniae.

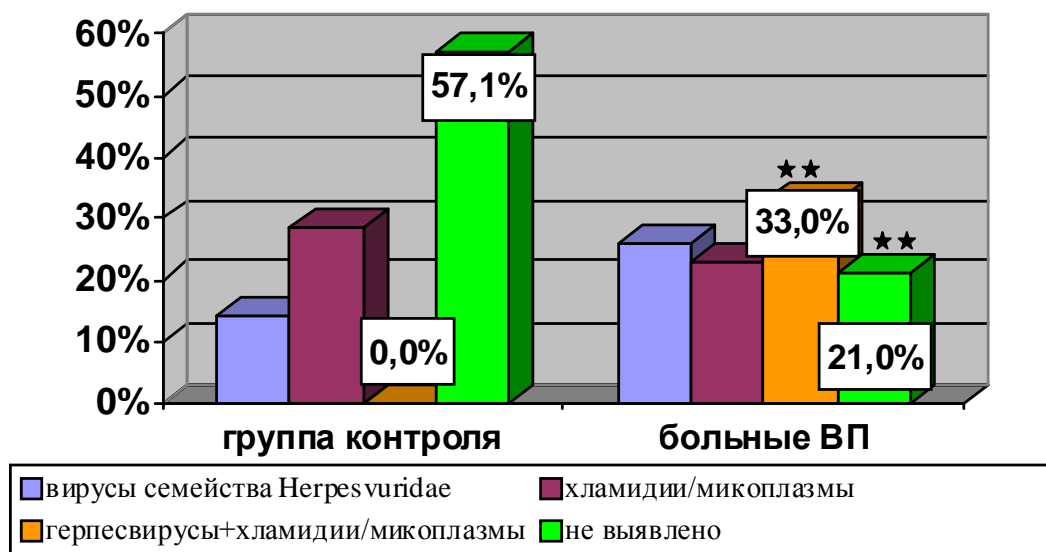


Рис. 3. Спектр диагностически значимых антител к возбудителям, выявленным в сыворотке крови больных внебольничной пневмонией методом ИФА. Примечание: отличие данных от показателей в группе контроля: ** - $p < 0,01$

У одной трети пациентов было сочетанное выявление диагностически значимых антител к вирусам семейства Herpesviridae и хламидиям/микоплазмам, а в группе контроля (ПЗЛ) этого практически не отмечалось (33% против 0%; $\chi^2=7,5$; $p=0,007$, OR=2,1) (рис. 3).

Оценка данных серодиагностики по группам показала, что для пациентов с адекватным течением выявляемость герпесвирусов и атипичных возбудителей была сопоставима с группой контроля (ПЗЛ). В группах «не отвечающей» и затяжной пневмонии выявляемость герпесвирусов возросла до 30% и до 50% ($\chi^2=4,5$; $p=0,03$, OR=6,0).

Таким образом, выявление особенностей течения ВП с позиции этиопатогенеза показало значимость выявления бактериально-вирусных, либо бактериально-хламидийных/микоплазменных ассоциированных инфекций. Развитие ВП на фоне активации вирусов семейства Herpesviridae повышает риск

развития нетипичного течения («не отвечающего на лечение в 2 раза, затяжного – в 6 раз) (рис. 4).

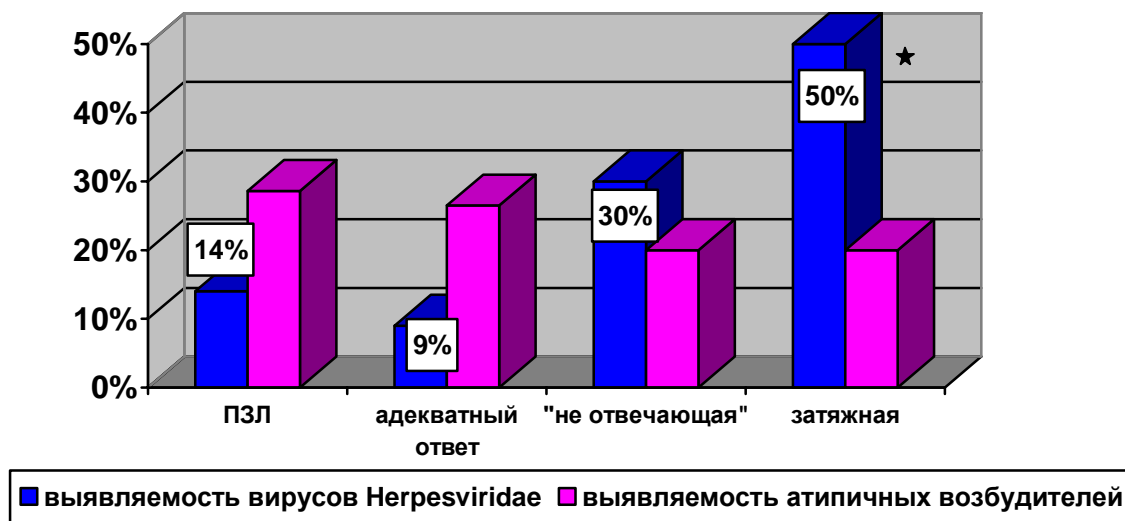


Рис. 4. Выявляемость диагностически значимых антител к оппортунистическим инфекциям в зависимости от течения пневмонии. Примечание: отличие данных от показателей в группе контроля: ★ - $p < 0,05$.

Анализ данных лейкограммы капиллярной крови у больных внебольничной пневмонией выявил нейтрофильный лейкоцитоз с увеличением количества зрелых фагоцитов – палочкоядерных ($p < 0,05$) и сегментоядерных ($p < 0,001$) нейтрофилов с относительной лимфопенией. Наиболее выраженные признаки активации макрофагально-фагоцитарного звена отмечались у больных с адекватным течением внебольничной пневмонии.

Оценка функциональных свойств фагоцитов показала, что, несмотря на увеличение количества нейтрофилов, выраженной активации функциональной способности нейтрофилов (фагоцитарный индекс и фагоцитарное число, показатели НСТ-теста). Отмечалась активация кислородзависимых ферментативных систем (НСТ-тест) только у больных с адекватным течением ВП (НСТ-тест (%) спонтанный $15,35 \pm 1,41$ по сравнению с $12,53 \pm 0,58$ в группе контроля, $p < 0,05$; НСТ-тест (%) стимулированный $35,03 \pm 1,12$ по сравнению с $30,58 \pm 1,22$ в группе контроля, $p < 0,05$). В группе больных с «не отвечающей» пневмонией метаболические свойства нейтрофилов характери-

зовались отсутствием значимой активации ферментативных кислородзависимых свойств нейтрофилов.

Следовательно, адекватное течение ВП характеризуется активацией фагоцитарного звена, тогда как «не отвечающая» на лечение пневмония сопровождается увеличением количественных показателей, однако показатели функциональной активности в отношении элиминационной способности нейтрофилов свидетельствуют о ее нарушении.

Исследование гуморального звена иммунитета выявило активацию гуморального звена, что проявлялось увеличением количества циркулирующих иммунных комплексов ($p < 0,05$) и IgA ($p < 0,05$). Оценка активности системы комплемента, обеспечивающей элиминацию ЦИК из организма, показала сохранность при адекватном ответе и выраженную недостаточность у больных с «не отвечающей» пневмонией (CH_{50} ед. - $50,30 \pm 6,90$ против $72,27 \pm 4,05$ в группе контроля, $p < 0,01$).

Результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови показали, что для всех пациентов с внебольничной пневмонией было характерно снижение процентного содержания субпопуляций Т-лимфоцитов, а именно CD4+ и CD8+ - лимфоцитов. У пациентов с «не отвечающей» на лечение пневмонией также имело место снижение уровня NK-клеток (натуральных киллерных клеток) – клеток первого уровня противовирусной и противоифекционной защиты – CD16+CD56+ ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля (рис.5).

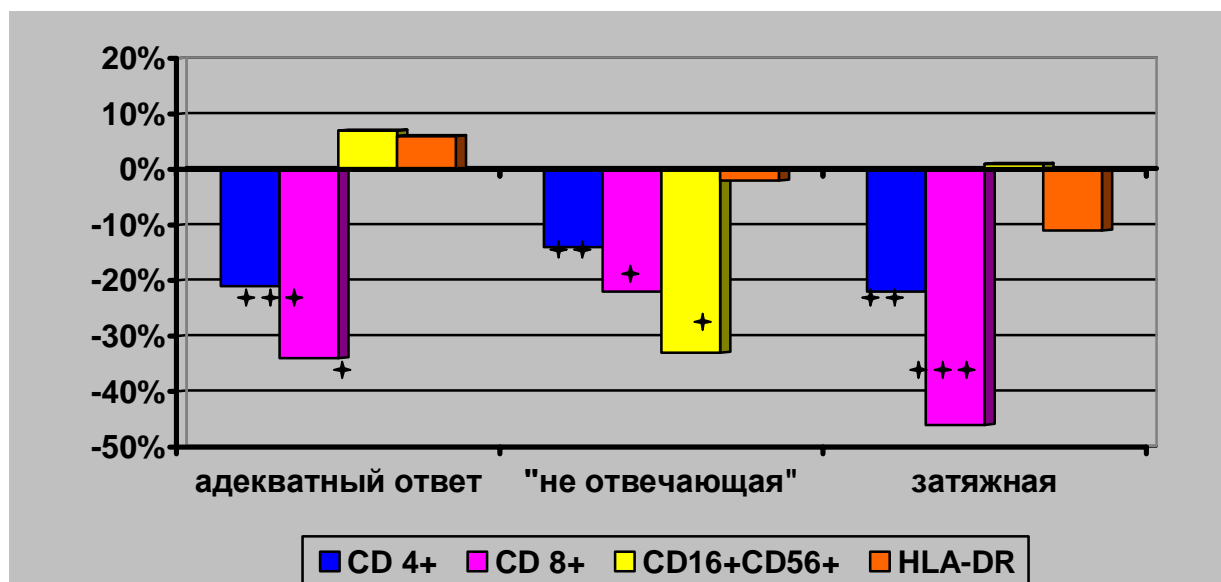


Рис.5. Отклонения в относительном содержании субпопуляций лимфоцитов от данных группы ПЗЛ у больных с различным течением внебольничной пневмонии (%). Примечание: отличие данных от показателей в группе контроля: + - $p < 0,05$; ++ - $p < 0,01$; +++ - $p < 0,001$.

Оценка функциональной активности Т-лимфоцитов показала адекватную продукцию миграцииингибирующих факторов (MIF) у больных с типичным течением внебольничной пневмонии. У пациентов с «не отвечающей» на лечение пневмонией получены данные о нарушении выработки MIF-факторов в виде их снижения ($p < 0,05$).

Таким образом, у больных внебольничной пневмонией отмечается преобладание гуморального (Th2) пути иммунного ответа с развитием недостаточности Т-лимфоцитарного звена (низкое содержание CD4+ и CD8+ лимфоцитов). «Не отвечающая» на лечение пневмония характеризуется также функциональной несостоятельностью Т-лимфоцитов (снижением способности к продукции MIF в РТМЛ) и недостаточностью NK-клеток, что свидетельствует о выраженном угнетении Т-клеточного звена и NK-клеток.

Суммарные показатели иммунной реактивности показали, что во всех группах отмечалась активация гуморального и фагоцитарного звеньев и недостаточность Т-клеточного звена. У пациентов с «не отвечающим» течением были снижены функциональные свойства нейтрофилов, комплементарная

активность, а несостоятельность Т-клеточного звена сопровождалась недостаточностью НК-клеток (табл.1).

Таблица 1 - Интегрированные показатели иммунной реактивности у больных с различным течением внебольничной пневмонией

Звенья иммунной системы		Больные с различным течением внебольничной пневмонии (n=84)		
		адекватный ответ (n=34)	«не отвечающая»(n=30)	затяжная (n=20)
Гуморальное звено		↑	↑	↑↑
Фагоц. звено	количество	↑	↑	↑
	функция	↑	=	=
Комплементарная активность		=	↓	=
Т-клеточное звено		↓	↓	↓
РТМЛ		↑	↓=	=
НК-клетки		=	↓	=

Примечание: ↑ - показатели были увеличены по сравнению с ПЗЛ, = - соответствовали данным ПЗЛ, ↓ - были снижены по отношению к ПЗЛ.

Учитывая недостаточность активации функциональных свойств нейтрофилов при нетипичном течении («не отвечающей» на лечение и затяжной), было проведено исследование одного из основных регулирующих хемокинов – интерлейкина-8 (IL-8).

Изучение содержания цитокина IL-8 в сыворотке крови и показателей цитокинпродуцирующей способности клеток крови (спонтанная и стимулированная ФГА) в зависимости от течения заболевания выявило свои особенности (табл.2).

У больных с адекватным ответом на лечение содержание IL-8 в сыворотке крови оказалось повышенным по сравнению с группой контроля, тогда как при «не отвечающей» и затяжной пневмонии выявлены низкие значения содержания цитокина в сыворотке, что свидетельствует о неадекватной реакции на воспалительный процесс и недостаточности его регулирующего влияния. Более того, в этих группах показатель резервных возможностей ци-

токинпродуцирующей способности был менее 1,5 и статистически достоверно отличался от группы контроля ($p < 0,05$).

Таблица 2 - Показатели продукции IL-8 у больных внебольничной пневмонией с различным течением воспалительного процесса

Продукция IL-8	Группа контроля (n=22)	Больные с различным течением внебольничной пневмонии (n=84)		
		адекватный ответ (n=34)	«не отвечающая» (n=30)	затяжная (n=20)
IL-8 сывороточный пг/мл	121,79±18,3	631,24±249,45*	76,65±40,33	69,22±31,93
IL-8 спонтанный пг/мл	2588,23±327,75	4260,85±342,79**	4521,88±500,63**	4463,06±366,98***
IL-8 стимулированный пг/мл	4452,17±108,49	4240,00±259,36	4703,48±520,38	4862,56±476,26
Индекс стимуляции	3,74±1,02	1,94±0,8	1,06±0,07*	1,12±0,08*

Примечание: статистическая значимость различий с группой контроля: *- $p < 0,05$;

** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Полученные данные свидетельствуют о нарушении адекватного ответа регуляторной цитокиновой системы межклеточных иммунных взаимодействий на антигенный стимул в состоянии повышенного напряжения.

Продукция IL-8 регулируется на генном уровне. По данным разных авторов, полиморфизм в позиции 251 промотерной части гена с заменой тимина (Т) на аденин (А) приводит либо к повышению продукции IL-8 при воспалительных процессах [Hull J., Thomson A., Kwiatkowski D., 2000; Gao L.Y.S., Maloney J., Zambelli A. et al., 2003], либо к снижению при туберкулезе легких [Selvaraj P., Prabhu Anand S., Jawahar M. S., Chandra G., Banurekha B. and Narayanan P. R., 2006]. Нами изучена частота встречаемости полиморфных вариантов гена (локус 251 Т/А), кодирующего IL-8, у больных ВП и их влияние на характер течения данного заболевания (ТТ, ТА, АА) (табл.3).

Таблица 3 - Распределение генотипов IL-8 (251 T/A) у больных внебольничной пневмонии в зависимости от течения заболевания

Генотипы IL-8	Группа контроля (n=82)		Больные с различным течением внебольничной пневмонии (n=62)					
			адекватный ответ (n=31)		«не отвечающая» (n=15)		затяжная (n=16)	
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
ТТ	24	29,3	10	32,3	0	0*	4	25
ТА	47	57,3	17	54,8	9	60	10	62,5
АА	11	13,4	4	12,9	6	40*	2	12,5

Примечание: статистическая значимость различий с группой контроля: *- $p < 0,05$.

Распределение генотипов у больных внебольничной пневмонией в зависимости от течения заболевания показало, что в группе острой пневмонии с адекватным ответом и затяжной пневмонии доля генотипа АА составила 12,9 % и 12,5%, что соответствует группе контроля. У больных с «не отвечающей» на лечение пневмонией генотип АА составил 40% ($\chi^2 = 4,49$ при $p = 0,03$, $OR = 4,3$) тогда как генотип ТТ вообще не встречался. Следовательно, выявление генотипа АА увеличивает риск развития нетипичного течения пневмонии в 4,3 раза. Наличие аллеля Т и более того, генотипа ТТ предотвращает риск развития нетипичного течения.

Полученные данные свидетельствуют о связи течения заболевания с характером продукции цитокина IL-8 – недостаточность ассоциируется со снижением резервных возможностей продукции хемокина и его уровня в сыворотке крови больных внебольничной пневмонией и характерна для пациентов с нетипичным течением заболевания.

Таким образом, недостаточность метаболической активности нейтрофилов у больных с нетипичным течением ВП обусловлена неадекватной продукцией IL-8 и ассоциируется с полиморфизмом гена IL-8 (гомозиготный генотип АА полиморфного локуса 251 T/A).

Оценка гормонального реагирования показала, что у пациентов с «не отвечающей» острой пневмонией наблюдался повышенный уровень кортизола ($p < 0,05$). В других группах показатели содержания кортизола практически не отличались от данных группы контроля. Имелись отличия в продукции половых гормонов во всех исследуемых группах: у мужчин отмечались сниженные значения тестостерона, особенно в группе «не отвечающей» на лечение пневмонии. У женщин, наоборот, значения пролактина были повышены.

Проведенный нами корреляционный анализ выявил особенности взаимоотношений состояния иммунной системы, продукции IL-8 и гормонального фона у больных с внебольничной пневмонией.

У пациентов с благоприятным течением пневмонии активация адаптивного иммунитета (CD4+; CD20+CD25+) сопряжена с активностью врожденных факторов (цитокинпродуцирующая способность клеток крови – спонтанная ($r=0,3$) и стимулированная ($r=0,4$) продукция IL-8) и количеством CD16+CD56+ (NK-клеток) ($r=0,66$).

Отмечалась обратная связь IL-8 продуцирующей способности клеток крови с уровнем гормонов: кортизола ($r= -0,3$) и пролактина ($r= -0,4$).

Корреляционные связи у пациентов с «не отвечающей» на лечение пневмонией показали прямую зависимость снижения показателей NK-клеток (CD16+CD56+), фагоцитоза, В-лимфоцитов и цитокинпродуцирующей способности клеток крови (IL-8 (сывороточный, спонтанная и стимулированная продукция IL-8) и обратную – с уровнем кортизола в крови (рис.6).

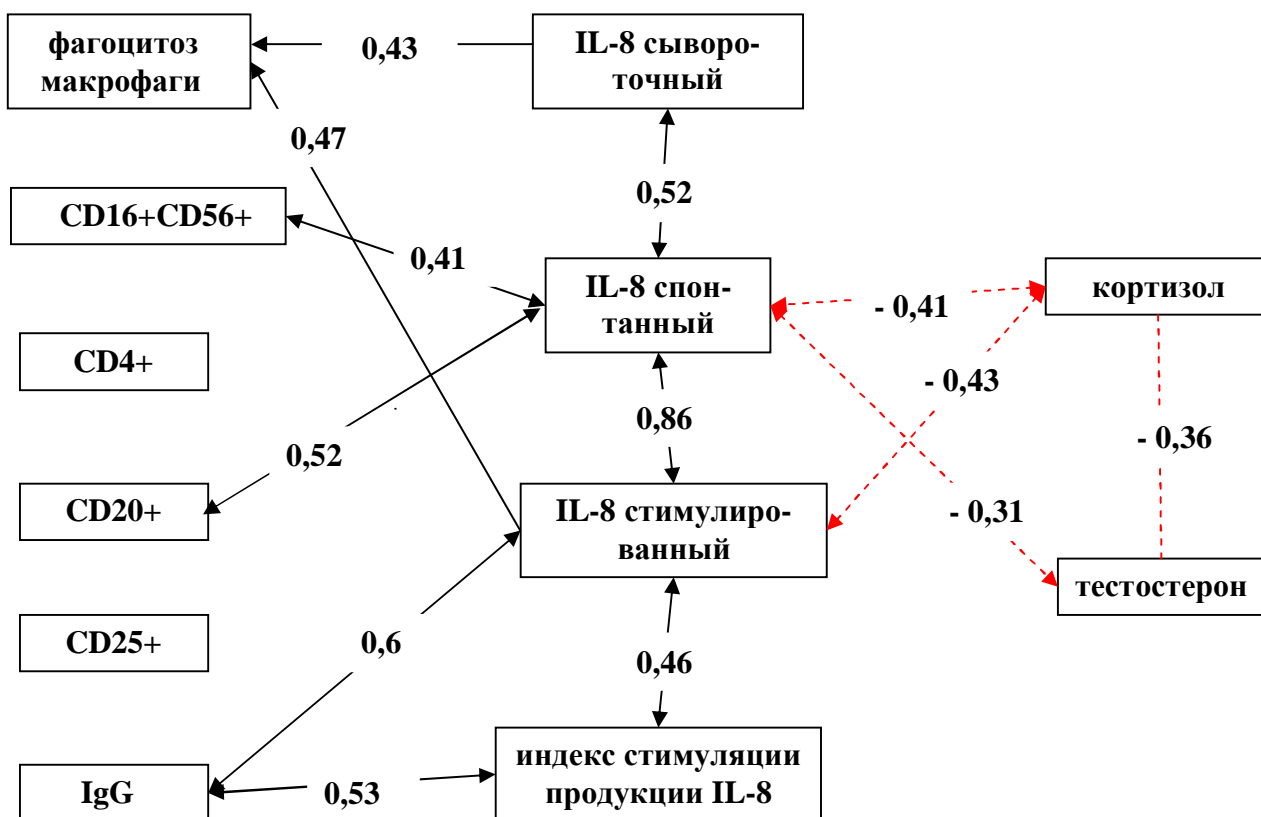


Рис.6. Корреляционные связи состояния иммунной системы, продукции IL-8 и гормонального фона у больных с «не отвечающим» течением внебольничной пневмонии

Таким образом, клиническими факторами риска развития нетипичного течения внебольничной пневмонии являются возраст 40-49 лет (48% против 16%); мультилобарность поражения (повышает риск в 8,4 раза); тяжесть течения воспалительного процесса с развитием шока (28% против 8%) и интоксикации (78% против 32%). Лабораторными критериями риска развития нетипичного течения внебольничной пневмонии являются недостаточность комплементарной активности; уровня НК-клеток и недостаточность продукции IL-8; генетически обусловленная недостаточность продукции IL-8 (выявление генотипа AA полиморфного локуса 251 Т/А гена IL-8 повышает риск в 4,3 раза).

На основании совокупной оценки таких критериев, как тяжесть течения воспалительного процесса, недостаточность НК-клеток и недостаточность продукции IL-8, нами разработан способ раннего прогнозирования нетипичного течения тяжелой формы ВП (табл. 4).

Таблица 4 - Частота сочетания низкого содержания натуральных киллеров (NK-лимфоциты, CD16+CD56+) (менее 10%) и IL-8 (менее 80 пг/мл) в крови больных внебольничной пневмонией в зависимости от формы и течения заболевания

Формы заболевания	Исходы заболевания		
	адекватный ответ (n=39)	«не отвечающая» (n=15)	всего (n=54)
Среднетяжелая форма пневмонии (n=31)	3 (27)	1 (4)	4 (31)
Тяжелая форма пневмонии (n=23)	0 (12)	6 (11)	6 (23)
Итого	3 (39)	7 (15)	10 (54)

Примечание: пример – 3 (27), т.е. у 3-х из 27 больных нетяжелой формой с выздоровлением выявлено сочетание низкого содержания натуральных киллеров и IL-8

Как следует из таблицы, среди больных с «не отвечающим» течением тяжелой формы пневмонии частота сочетания низкого содержания натуральных киллеров (NK-лимфоциты, CD16+CD56+) и интерлейкина-8 в сыворотке крови составила 54,5% (у 6 из 11), тогда как в категории больных с выздоровлением – 0% (0 из 12) ($\chi^2=6,3$ при $p=0,01$, OR более 13,2).

Таким образом, выявление содержания натуральных киллеров (NK-лимфоциты, CD16+CD56+) менее 10% и уровня интерлейкина-8 в сыворотке крови менее 80 пг/мл у больных с тяжелой формой внебольничной пневмонии, является неблагоприятным маркером развития нетипичного (медленно разрешающегося) течения воспалительного процесса и повышает риск развития нетипичного исхода более чем в 13 раз. Тактика ведения и лечения таких больных требует дополнительных лечебных и реабилитационных мероприятий.

ВЫВОДЫ:

1. Клиническими факторами риска формирования нетипичного течения внебольничной пневмонии является возраст 40-49 лет, объемность поражения и тяжесть течения воспалительного процесса (шок и миокардиодист-

рофия), повышающие вероятность нетипичного исхода заболевания более чем в 8 раз.

2. Этиологически значимой для внебольничной пневмонии являются бактериальная флора – грамположительные возбудители (*Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*), грамотрицательная флора (*Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria spp.*, *Enterobacter aerogenes*) в сочетании с активацией возбудителей оппортунистических инфекций (вирусов семейства *Herpesviridae* и/или хламидий /микоплазм).

3. Иммунное реагирование у больных внебольничной пневмонией сопровождается формированием эффекторного ответа по гуморальному пути (Th-2) с подавлением клеточного (Th-1). Адекватное течение заболевания сопряжено с активацией факторов 1-ой линии защиты – фагоцитарной и комплементарной систем и цитокинпродуцирующей (IL-8) способности клеток крови; нетипичное течение – их недостаточностью в сочетании с угнетением натуральных киллеров (NK-клеток).

4. Нетипичное течение внебольничной пневмонии характеризуется недостаточностью цитокинпродуцирующей способности (IL-8) клеток цельной крови в ассоциации с гомозиготным генотипом AA гена IL-8 (полиморфного локуса 251 T/A).

5. Внебольничная пневмония сопровождается недостаточностью тестостерона у мужчин, у женщин – повышенной продукцией пролактина. Нетипичное течение внебольничной пневмонии характеризуется повышенной продукцией кортизола, высоким уровнем пролактина у женщин и выраженной недостаточностью тестостерона у мужчин. Эффекторное воздействие гормонов реализуется через иммуносупрессивное влияние на IL-8 продуцирующую способность клеток крови.

6. Критериями раннего прогнозирования нетипичного течения ВП являются тяжелая форма заболевания, низкий уровень NK-клеток (менее

10%) и интерлейкина-8 в сыворотке крови (менее 80 пг/мл) (повышают риск развития более чем в 13 раз).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В выборе тактики лечения внебольничной пневмонии следует учитывать известные факторы риска развития нетипичного течения воспалительного процесса - мужской пол, возраст старше 60 лет, объемность поражения, тяжесть течения воспалительного процесса.

2. Антибактериальную терапию назначать в максимально ранние сроки с учетом известных вероятных возбудителей и результатов микробиологического исследования.

3. По возможности, проводить серологическое обследование больных ВП на выявление антител острого периода к вирусам семейства Herpesviridae. Наличие данного признака повышает риск развития нетипичного течения заболевания в 2 раза, затяжного – в 6 раз.

4. Больным с тяжелыми формами внебольничной пневмонии рекомендуется комплексная оценка иммунного статуса: системы комплемента, Т-клеточного звена, уровня натуральных киллерных клеток (NK-лимфоцитов CD16+CD56+), продукции хемокина IL-8. Снижение данных показателей является маркером неблагоприятного течения и требует применения дополнительных лечебных мероприятий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Козырева, Л.С. Иммунологические особенности больных с тяжелой формой внебольничной пневмонии и их прогностическая значимость / Л.С. Козырева, Л.Ф. Азнабаева, В.И. Никуличева // **Цитокины и воспаление.** – 2010. – Т.9, №2. – С.52-56.

2. Козырева, Л.С. Хемотаксический фактор IL-8 у больных внебольничной пневмонией и особенности полиморфизма его гена (мутация в локусе 251 Т/А) / Л.С. Козырева, Л.Ф. Азнабаева, Т.В. Викторова, В.И. Никуличева // **Медицинская иммунология.** – 2010. – Т.12, №4/5. – С.355-360.

3. Козырева, Л.С. Спектр, частота и прогностическая значимость возрастных, гендерных и клинико-функциональных проявлений у больных внебольничной пневмонией / Л.С. Козырева, В.И. Никуличева, Л.Ф. Азнабаева, Т.И. Веревкина // **Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И.Мечникова**. - 2009. – №2/1(31). – С. 69-74.

4. Козырева, Л.С. Иммунологические особенности больных с тяжелой формой внебольничной пневмонии и их прогностическая значимость / Л.С. Козырева, Л.Ф. Азнабаева, В.И. Никуличева // **Современные наукоемкие технологии**. – 2010. - №2. – С.71-73.

5. Козырева, Л.С. Способ прогнозирования развития затяжного течения у больных с тяжелой формой внебольничной пневмонии / Л.С. Козырева, Л.Ф. Азнабаева, В.И. Никуличева, О.А. Богородицкая // Положительное решение о выдаче патента на изобретение № 2009120971/15(028977) от 09.06.10.