

Nespecifinio uždegimo tyrimas paūmėjus lėtinei obstrukcinei plaučių ligai

Mindaugas Vaitkus

LSMU MA Pulmonologijos ir imunologijos klinika

Šių metų rugpjūčio 26 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos (LSMU MA) viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje buvo apginta Mindaugo Vaitkaus daktaro disertacija pavadinimu *Nespecifinis uždegimas paūmėjus lėtinei obstrukcinei plaučių ligai* (biomedicinos mokslai, medicina). Mokslinis vadovas – prof. dr. Raimundas Sakalauskas. Disertacija rengta 2009–2014 metais LSMU MA Pulmonologijos ir imunologijos klinikoje gavus Kauno regioninio biomedicininų tyrimų komiteto leidimą.

Lėtinė obstrukcinė plaučių liga (LOPL) – šiuo metu pasaulyje viena svarbiausių lėtinį sergamumą ir mirtingumą sąlygojančių ligų. Pacientams, kuriems pasunkėja kasdieniai LOPL simptomai, pasireiškia LOPL paūmėjimas, kurio metu sutrinka kasdienė veikla ir reikia keisti skirtų vaistų vartojimą. Dažni LOPL paūmėjimai, daugiau nei trys paūmėjimai per metus, susiję su didesniu LOPL pacientų mirtingumu. Nustatyta, jog daugiau nei 50 proc. sergančių LOPL paūmėjimą sukelia infekcija kvėpavimo takuose. Pūlingus skreplius atkosintys pacientai dažniau serga LOPL paūmėjimais nei tie, kuriems pasireiškia tik peršalimo ar viršutinių kvėpavimo takų infekcijos simptomai

LOPL paūmėjimo metu sustiprėja uždegimas kvėpavimo takuose, dėl to pažeidžiamas plaučių audinys bei progresuoja bronchų obstrukcija. Įrodyta, jog LOPL paūmėjimo metu kinta ne tik lėtinis uždegimas kvėpavimo takuose, bet pasikeičia uždegimo ląstelių aktyvumas sisteminėje kraujotakoje. Tiriant skreplius ar bronchų biopsinę medžiagą nustatomas ženkliai padidėjęs neutrofilų, eozinofilų ir makrofagų skaičius bei šių ląstelių išskiriamų citokinų ir chemokinų kiekis, kas sąlygoja užsitęsusių uždegimą kvėpavimo takuose.

Pasaulio literatūroje publikuoti darbai, kurie nagrinėjo atskirus uždegimo ląstelių aktyvumo (apoptozės, chemotaksio, fagocitozės ir reaktyviųjų deguonies formų susidarymo) pokyčius LOPL paūmėjimo metu. Aprašytuose darbuose dažniausia lyginti paūmėjusia LOPL ir stabilia LOPL sergantys pacientai arba paūmėjimo metu gauti rezultatai su sveikų asmenų tyrimo duomenimis. Nepavyko rasti mokslinių darbų, kuriuose būtų vertinti duomenys apie vietinio ir sisteminio imuninio atsako pokyčius LOPL paūmėjimo metu ir esant ligos remisijai.

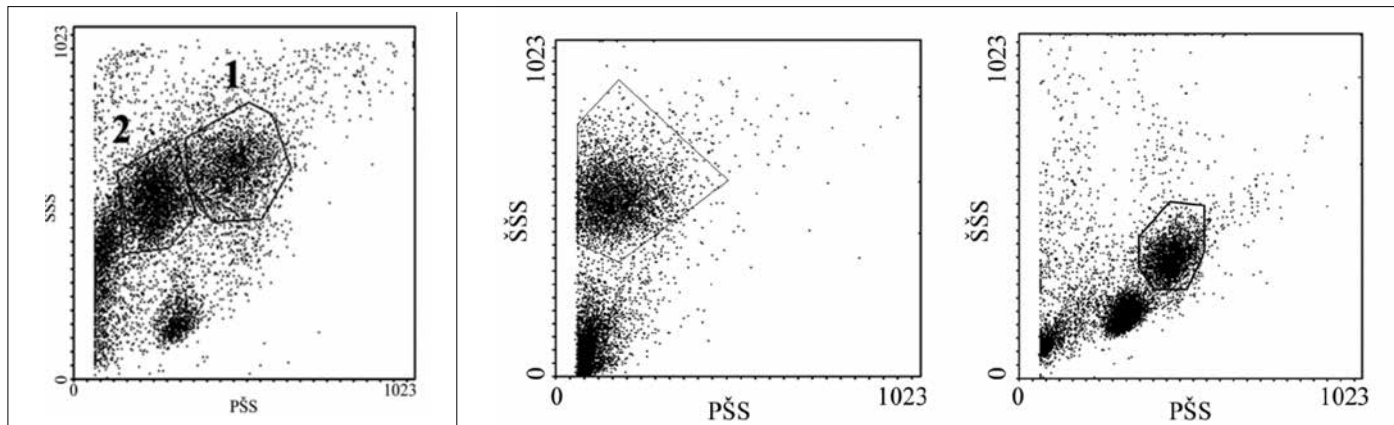
TYRIMO TIKSLAS

2009–2013 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Pulmonologijos ir imunologijos klinikoje buvo atliktas mokslinis tyrimas, kurio tikslas – įvertinti nespecifinį uždegimą paūmėjus LOPL.

UŽDAVINIAI

Buvo iškelti šie uždaviniai:

- Nustatyti periferinio kraujo ir indukuotų skreplių ląstelių sudėties ypatumus ir įvertinti galimas sąsajas su plaučių funkcijos rodikliais bakterinio ir nebakterinio lėtinės obstrukcinės plaučių ligos paūmėjimo metu.
- Ištirti sergančių bakterinės kilmės LOPL paūmėjimu indukuotų skreplių neutrofilų ir makrofagų apoptozę, fagocitozę ir reaktyviųjų deguonies formų susidarymo ypatumus bei palyginti su nebakteriniu paūmėjimu.
- Įvertinti sergančių bakterinės ir nebakterinės kilmės lėtinės LOPL paūmėjimu periferinio kraujo neutrofilų ir monocitų apoptozę bei chemotaksį ir periferinio kraujo neutrofilų fagocitozės ir reaktyviųjų deguonies formų susidarymo ypatumus.
- Ištirti sergančių bakterinės ir nebakterinės kilmės LOPL paūmėjimu interleukino-8 koncentraciją ir galimas sąsajas su periferinio kraujo neutrofilų chemotaksio bei C reaktyviojo baltymo koncentracijos periferinio kraujo serume sąsajas su plaučių funkcija ir rūkymo intensyvumu.



1 pav. LOPL paūmėjimu sergančio paciento tėkmės citometrijos taškinė diagrama, reprezentuojanti indukuotų skreplių neutrofilus ir makrofagus

1 – indukuotų skreplių neutrofilai, 2 – indukuotų skreplių makrofagai.

2 pav. LOPL paūmėjimu sergančio paciento tėkmės citometrijos taškinė diagrama, reprezentuojanti periferinio kraujo neutrofilus ir monocitus

Kairėje – periferinio kraujo neutrofilai (pasirinktame regione), dešinėje – periferinio kraujo monocitai (pasirinktame regione).

ŠSS – šoninė šviesos sklaida, PSS – priekinė šviesos sklaida.

METODIKA

Į tyrimą įtraukti 50 pacientų, kuriems diagnozuota LOPL remiantis Pasaulinės lėtinės obstrukcinės plaučių ligos iniciatyvos (GOLD, angl. *Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) kriterijais, esant šios ligos paūmėjimui, jie tirti ir ligos remisijos metu, taip pat 10 rūkančių sveikų ir 10 nerūkančių sveikų asmenų, kaip kontrolinė grupė. Paūmėjusios LOPL pacientų įtraukimo kriterijai: amžius 40–80 metų; anamnezėje diagnozuota vidutinio sunkumo arba sunki LOPL remiantis GOLD rekomendacijomis; rūkymas ≥ 10 pakmečių; nė vienas pacientas nebuvo gydytas sisteminio poveikio gliukokortikoidais ir (ar) antibiotikais 1 mėnuo prieš įtraukimą į tyrimą; LOPL paūmėjimas diagnozuotas remiantis Anthonisen kriterijais ir truko ne ilgiau kaip dvi dienas iki įtraukimo į tyrimą; pacientams jau skirti inhaliuojamieji gliukokortikoidai. LOPL paūmėjimu sergantys pacientai sugrupuoti į sergančius bakteriniu LOPL paūmėjimu (LOPL paūmėjimo metu pacientai iškosi pūlingų skreplių ir mikrobiologiniame tyrime buvo išskirtas sukėlėjas) ir sergančius nebakteriniu LOPL paūmėjimu, o sveiki asmenys – į rūkančiuosius ir nerūkančiuosius.

Ligoniams LOPL paūmėjimo metu ir sveikiems tiriamiesiems surinkta anamnezė, atliktas klinikinis ištyrimas, spirometrija su bronchų dilataciniu mėginiu, elektrokardiograma, bendrojo kraujo bei CRB tyrimai, krūtinės ląstos rentgenograma, iš periferinio kraujo iškirti neutrofilai ir monocitai, o iš indukuotų skreplių – neutrofilai ir makrofagai, vertintos jų funkcijos, skreplių pasėlis. Pacientai atsakė į Šv. Jurgio kvėpavimo klausimyną. Greta įprastinio ligos gydymo, skirtas gydymas geriamaisiais gliukokortikoidais, antibiotikai skirti esant klinikiniams bakterinės infekcijos požymiams. Gydymas antibiotikais tikslintas pagal sukėlėjo jautrumą. LOPL paūmėjimo gydymas skirtas 10 dienų. Išnykus LOPL paūmėjimo simptomams ir sugrįžus prieš paūmėjimą

buvusiems plaučių funkcijos rodikliams per 35 dienas nuo paūmėjimo pradžios liga vertinta kaip remisija. Ligos remisijos metu atlikti tyrimai kaip ir per pirmą vizitą. Tęstas įprastinis gydymas vaistais pagal LOPL sunkumą.

Uždegimo ląstelių tyrimui buvo paimta kraujo iš periferinės venos bei indukuoti skrepliai. Siekiant ištirti skreplių neutrofilus ir makrofagus, visiems tiriamiesiems buvo indukuoti skrepliai hipertoniiniu natrio chlorido tirpalu. Vertintas indukuotų skreplių neutrofilų ir makrofagų bei periferinio kraujo neutrofilų ir monocitų absoliutusis ir santykinis skaičius. Interleukino-8 koncentracija kraujo serume ir indukuotuose skrepliuose vertinta ELISA metodu, C reaktyviojo baltymo koncentracija – turbidimetriniu metodu.

Uždegimo ląstelių funkcijos, kaip antai: apoptozė, chemotaksis, fagocitozė ir reaktyviųjų deguonies formų susidarymas, analizuotos naudojant tėkmės citometrą (*FACSCalibur, BD Biosciences, JAV*). Tėkmės citometrijos taškinės diagramos su apibrėžtais regionais, reprezentuojančios vieno asmens, sergančio LOPL paūmėjimu, indukuotų skreplių neutrofilus ir makrofagus bei periferinio kraujo neutrofilus ir monocitus, pateiktos 1 ir 2 paveiksluose.

REZULTATAI

Vertinant tiriamųjų amžių, kūno masės indeksą ir kumuliacinį rūkymo intensyvumą skirtumo tarp tiriamųjų grupių nenustatyta. Nustatyta, jog bakterinio LOPL paūmėjimo metu reikšmingai sumažėja plaučių funkcijos rodikliai FEV₁ ir FVC, lyginant su nebakteriniu paūmėjimu ir ligos remisija ($p < 0,05$). Analizuojant Šv. Jurgio liginės kvėpavimo klausimyną, nustatytas reikšmingai didesnis balų skaičius bakterinio LOPL paūmėjimo metu nei nebakterinio ir ligos remisijoje ($p < 0,05$). Tiriamųjų charakteristika pateikiama 1 lentelėje.

1 lentelė. Tiriamųjų charakteristika

Požymiai	Bakterinis LOPL paūmėjimas (n = 23)	LOPL remisija (po bakt.) (n = 23)	Nebakterinis LOPL paūmėjimas (n = 27)	LOPL remisija (po nebakt.) (n = 27)	„Sveiki“ rūkantieji (n = 10)	Sveiki nerūkantieji (n = 10)
Amžius (metai),		66 ± 3,1		65,6 ± 2,8	60,3 ± 3,2	61,0 ± 14
KMI, kg/m ²		23,9 ± 2,0		23,0 ± 1,4	26,4 ± 1,5	25,7 ± 1,7
FEV ₁ , l	1,20 ± 0,2*	1,34 ± 0,1	1,22 ± 0,1**	1,36 ± 0,1	4,38 ± 0,2#	4,50 ± 0,1#
FEV ₁ , proc. b d.	33,8 ± 3,3*	41,4 ± 3,0	36,1 ± 11,2**	42,0 ± 3,9	112,3 ± 12,7#	112,7 ± 7,8#
FVC, l	2,20 ± 0,1*	2,35 ± 0,1	2,21 ± 0,1**	2,36 ± 0,1	5,27 ± 0,2#	5,26 ± 0,2#
FEV ₁ /FVC	56,6 ± 9,0	56,8 ± 3,3	55,2 ± 5,0	57,5 ± 3,0	83,2 ± 4,8#	85,7 ± 4,1#
Rūkymo pakmečiai		33,2 ± 5,1		29,7 ± 6,8	24 ± 3,1	-
Šv. Jurgio kvėpavimo klausimynas, balai	53,4 ± 2,5*	44,4 ± 2,5	56,3 ± 1,7**	47,7 ± 3,0	27,8 ± 3,7#	22,6 ± 2,7#

Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. n – tiriamųjų skaičius, l – litrai, proc. – procentai, b.d. – būtinąjo dydžio, LOPL remisija (po bakt.) – LOPL remisija po bakterinio LOPL paūmėjimo, LOPL remisija (po nebakt.) – LOPL remisija po nebakterinio LOPL paūmėjimo. *p < 0,05, lyginant su LOPL remisija (po bakt.); **p < 0,05, lyginant LOPL remisija (po nebakt.); #p < 0,05, lyginant su visomis LOPL sergančiųjų grupėmis.

2 lentelė. Indukuotų skreplių ląstelių sudėties palyginimas sergančių LOPL paūmėjimu ir remisijos būklės LOPL bei sveikų asmenų grupėse

Požymis	Bakterinis LOPL paūmėjimas (n = 23)	LOPL remisija (po bakt.) (n = 23)	Nebakterinis LOPL paūmėjimas (n = 27)	LOPL remisija (po nebakt.) (n = 27)	„Sveiki“ rūkantieji (n = 10)	Sveiki nerūkantieji (n = 10)
Neutrofilai, ×10 ⁶ /ml	1,94* (1,67–2,40)	1,68 (1,48–2,00)	1,76** (1,62–2,30)	1,66 (1,46–1,95)	0,55# (0,47–0,78)	0,45# (0,34–0,50)
Makrofagai ×10 ⁶ /ml	0,75* (0,38–0,99)	0,58 (0,32–0,84)	0,69** (0,52–0,92)	0,56 (0,21–0,75)	0,81# (0,65–0,96)	0,79# (0,76–1,14)

Duomenys pateikti kaip mediana (min.–maks.). LOPL remisija (po bakt.) – LOPL remisija po bakterinio LOPL paūmėjimo; LOPL remisija (po nebakt.) – LOPL remisija po nebakterinio LOPL paūmėjimo; *p < 0,05, lyginant su LOPL remisija (po bakt.) ir nebakteriniu LOPL paūmėjimu; **p < 0,05, lyginant su LOPL remisija (po nebakt.); #p < 0,05, lyginant su visomis LOPL sergančiųjų grupėmis; †p < 0,05, lyginant su LOPL remisijų grupėmis.

3 lentelė. Periferinio kraujo ląstelių sudėties palyginimas sergančių LOPL paūmėjimu ir remisijos būklės LOPL bei sveikų asmenų grupėse

Požymiai	Bakterinis LOPL paūmėjimas (n = 23)	LOPL remisija (po bakt.) (n = 23)	Nebakterinis LOPL paūmėjimas (n = 27)	LOPL remisija (po nebakt.) (n = 27)	„Sveiki“ rūkantieji (n = 10)	Sveiki nerūkantieji (n = 10)
Neutrofilai, ×10 ⁹ /l	4,87* (4,67–5,44)	4,37 (4,21–4,58)	4,86** (4,62–5,30)	4,22 (4,15–4,95)	3,75# (3,55–3,81)	3,65† (3,40–3,78)
Proc.	77,23* (74,58–79,57)	62,04 (58,23–63,57)	75,64** (67,87–77,58)	61,24 (57,47–62,34)	56,81# (53,24–58,04)	56,75† (52,47–57,84)
Monocitai, ×10 ⁹ /l	0,71* † (0,67–0,79)	0,57 (0,48–0,67)	0,65** (0,62–0,70)	0,56 (0,47–0,62)	0,47# (0,39–0,48)	0,45# (0,41–0,49)
Proc.	7,34* † (6,97–7,54)	7,01 (6,57–7,27)	7,27** (6,84–7,40)	7,01 (6,58–7,25)	6,37# (6,29–6,74)	6,36# (6,27–6,68)

Duomenys pateikti kaip mediana (min.–maks.). n – tiriamųjų skaičius; LOPL remisija (po bakt.) – LOPL remisija po bakterinio LOPL paūmėjimo, LOPL remisija (po nebakt.) – LOPL remisija po nebakterinio LOPL paūmėjimo. *p < 0,05, lyginant su LOPL remisija (po bakt.); **p < 0,05, lyginant su LOPL remisija (po nebakt.); #p < 0,05, lyginant su visomis LOPL sergančiųjų grupėmis ir sveikais nerūkanciaisiais; †p < 0,05, lyginant su visomis LOPL sergančiųjų grupėmis ir „sveikais“ rūkanciaisiais; ‡p < 0,05, lyginant su nebakteriniu LOPL paūmėjimu.

Vyraujančios ląstelės indukuotuose skrepliuose – neutrofilai. Nustatytas reikšmingas šių ląstelių absoliučiojo ir santykinio skaičiaus padidėjimas bakterinio LOPL paūmėjimo metu nei nebakterinio ir remisijoje (p < 0,05). Panašūs duomenys gauti nagrinėjant indukuotų skreplių makrofagų skaičių – daugiausia nustatyta bakterinio LOPL paūmėjimo metu. Periferinio kraujo neutrofilų ir monocitų absoliutusis ir santykinis skaičius reikšmingai padidėja bakterinio LOPL paūmėjimo metu, lyginant su nebakteriniu ir ligos remisija (p < 0,05). Indukuotų skreplių ir periferinio kraujo ląstelių sudėtis sergančių paūmėjusia LOPL, ligos remisijoje ir sveikų asmenų grupėje pateikta 2 ir 3 lentelėse.

Nustatytos atvirkštinės sąsajos tarp indukuotų skreplių neutrofilų ir makrofagų bei periferinio kraujo neutrofilų ląstelių skaičiaus ir plaučių funkcijos rodiklio FEV₁ bakterinio ir nebakterinio LOPL paūmėjimų bei remisijų grupėse. Analizuojant indukuotų skreplių neutrofilų ir makrofagų bei periferinio kraujo neutrofilų ląstelių skaičius ir kumuliacinį rūkymo intensyvumą gautos tiesioginės sąsajos. Sveikų asmenų grupėse sąsajų negauta.

Indukuotų skreplių neutrofilų ir makrofagų apoptozė ir fagocitozė reikšmingai susilpnėjo bakterinio LOPL paūmėjimo metu, lyginant su nebakteriniu paūmėjimu, ligos remisija bei visomis sveikų asmenų grupėmis (p < 0,05). Daugiausia reaktyviųjų degunies formų susidaro

LOPL paūmėjimo metu, ypač bakterinio LOPL paūmėjimo, lyginant su nebakteriniu ($p < 0,05$) ir remisija ($p < 0,05$).

Nustatyta, jog periferinio kraujo neutrofilų ir monocitų apoptozė susilpnėja bakterinio LOPL paūmėjimo metu, lyginant su nebakteriniu ir ligos remisija ($p < 0,05$). Chemotaksis sustiprėja LOPL paūmėjimo metu reikšmingai labiau bakterinio nei nebakterinio ($p < 0,05$). LOPL remisijų metu pastebėtas chemotaksio susilpnėjimas, lyginant su LOPL paūmėjimu ($p < 0,05$), bet stipresnis, lyginant su sveikais asmenimis ($p < 0,05$). Periferinio kraujo neutrofilų fagocitozė sumažėja reikšmingai labiau bakterinio LOPL paūmėjimo metu nei nebakterinio ($p < 0,05$). Tirtų ląstelių fagocitozė sustiprėja ligos remisijos metu, bet išlieka silpnesnė nei sveikų asmenų ($p < 0,05$). ROS susidarymas periferinio kraujo neutrofiluose intensyviausias buvo bakterinio LOPL paūmėjimo metu nei nebakterinio metu, panašūs duomenys gauti aktyvuojant ląsteles *S. aureus* bakterijomis ir cheminiu – forbolio misristato acetatu (PMA).

Nustatytas tiesioginis ryšys tarp migravusių periferinio kraujo neutrofilų ir indukuotų skreplių neutrofilų. IL-8 koncentracija tiesiogiai paveikė migravusių periferinio kraujo neutrofilų skaičių visose sergančių LOPL grupėse. Sveikų asmenų IL-8 ir migravusių neutrofilų sąsają nerasta.

IŠVADOS

Iš gautų rezultatų suformuluotos šios išvados:

- Padidėjęs periferinio kraujo neutrofilų ir monocitų bei indukuotų skreplių neutrofilų ir makrofagų skaičius yra susijęs su pablogėjusia plaučių funkcija ir rūkymo intensyvumu bakterinės ir nebakterinės kilmės lėtinės obstrukcinės plaučių ligos paūmėjimo metu.
- Indukuotų skreplių neutrofilų ir makrofagų apoptozė bei fagocitozė susilpnėja, o reaktyviųjų deguonies formų susidarymas labiau padidėja bakterinio lėtinės obstrukcinės plaučių ligos paūmėjimo metu, lyginant su nebakteriniu paūmėjimu.
- Nustatytas pakitęs periferinio kraujo neutrofilų ir monocitų aktyvumas bakterinės kilmės lėtinės obstrukcinės plaučių ligos paūmėjimo metu, lyginant su nebakterinės kilmės paūmėjimu, – susilpnėjusi neutrofilų ir monocitų apoptozė ir fagocitozė, sustiprėjęs chemotaksis bei padidėjęs periferinio kraujo neutrofilų reaktyviųjų deguonies formų susidarymas.
- Bakterinės ir nebakterinės kilmės lėtinės obstrukcinės plaučių ligos paūmėjimo metu padidėjusi interleukino-8 koncentracija susijusi su sustiprėjusiu periferinio kraujo neutrofilų chemotaksium, o C reaktyviojo baltymo padidėjusi koncentracija nesusijusi su plaučių funkcija ir rūkymo intensyvumu.

Šiame darbe nauja buvo tai, jog pateikti duomenis apie uždegimo ląstelių aktyvumą skirtingos kilmės (infekcinio

ir neinfekcinio) LOPL paūmėjimo metu. Atliktame darbe pirmą kartą publikuoti vietinio ir sisteminio uždegimo tyrimo duomenys LOPL paūmėjimo bei remisijos metu tiriant tuos pačius pacientus. Tuo labiau yra nedaug paskelbtų tyrimų apie vietinio ir sisteminio uždegimo atsako pokyčius LOPL paūmėjimo ir ligos remisijos metu, kas buvo atlikta šioje studijoje.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Šio mokslinio tyrimo rezultatai suteikia naujos informacijos apie uždegimo ląstelių ir žymenų pokyčius LOPL paūmėjimo ir remisijos metu.

Remiantis tyrimo duomenimis, galima teigti, jog priklausomai nuo sukėlėjo, sąlygojančio LOPL paūmėjimą, kilmės keičiasi uždegimo ląstelių funkcinis aktyvumas kvėpavimo takuose ir kraujyje.

C reaktyviojo baltymo bei interleukino-8 koncentracijos nustatymas gali būti naudingas ankstyvai LOPL paūmėjimo diagnostikai.

Uždegimo ląstelių skaičiaus kraujyje ir skrepliuose, C reaktyviojo baltymo bei interleukino-8 kiekio nustatymas gali būti vertingi atskiriant bakterinę LOPL paūmėjimą nuo nebakterinio iki gaunant mikrobiologinio tyrimo rezultatus.

PADĖKA

Norėčiau labai padėkoti šio mokslinio darbo vadovui prof. Raimundui Sakalauskui už rūpestingą ir kūrybingą vadovavimą atliekant mokslinį darbą. Dėkoju biologėms Simonai Lavinskienei ir Justinai Kiseliūnaitei už pagalbą atliekant praktinę šio tiriamojo darbo dalį. Nuoširdžiai dėkoju visam Pulmonologijos ir imunologijos klinikos kolektyvui už pagalbą siekiant užsibrėžto tikslo.

NON-SPECIFIC INFLAMMATION DURING ACUTE EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

MINDAUGAS VAITKUS
DEPARTMENT OF PULMONOLOGY AND IMMUNOLOGY
ACADEMY OF MEDICINE LUHS

Keywords: acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, non-specific inflammation, apoptosis, chemotaxis, phagocytosis, reactive oxygen species, interleukin-8, C reactive protein.

Summary. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by airflow limitation which is not fully reversible. It is a treatable and preventable disease but progressive and associated with an abnormal inflammatory response of the lung to noxious particles or gases. The non-specific inflammation increased during acute exacerbation of COPD. Studies have shown that inflammation in COPD are co-dependent and strongly interrelated processes not only in local, but also in systemic inflammation in the lungs.