

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 616.248:616-085

¹ Базарбанина Е.А., ¹ Степанова О.В., ² Лукьянов С.А.,
² Шаповалов К.Г., ³ Розенберг О.А.

**ВЛИЯНИЕ СУРФАКТАНТ-ТЕРАПИИ НА СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ
 СУРФАКТАНТ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ, ЦИТОКИНОВ
 И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ПАЦИЕНТОВ
 С ГОРМОНАЛЬНО-ЗАВИСИМОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

¹ ГУЗ «Краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения
 Забайкальского края, 672038, г. Чита, ул. Коханского, 7;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
 высшего образования «Читинская государственная медицинская академия»
 Министерства здравоохранения Российской Федерации, 672000, г. Чита, ул. Горького, 39-а.

³ ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
 им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, 197758, Санкт-Петербург,
 поселок Песочный, ул. Ленинградская, д. 7

Цель исследования. Оценить влияние курса сурфактант-терапии у больных бронхиальной астмой на содержание в крови сурфактант-ассоциированных белков (HSP-A и HSP-D), некоторых цитокинов и иммуноглобулинов класса G.

Материалы и методы. Выполнено экспериментальное, проспективное исследование влияния курса терапии препаратом Сурфактант-БЛ (ООО «Биосурф», Санкт-Петербург, Россия) у 28 пациентов обоего пола с частично контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой тяжелого течения, получающих кортикостероидную терапию, на динамику в крови сурфактант-ассоциированных белков, некоторых цитокинов и иммуноглобулинов класса G. С помощью метода ИФА и газовой хроматографии оценивалась концентрация в крови сурфактант-ассоциированных белков (HSP-A, HSP-D) реактивами фирмы Bio Vendor - Laboratorní medicína a. s. (Czech Republic), цитокинов (IL-10, IL-13, IL-23, TNF α) - Cloud-clone Corp (USA) и иммуноглобулинов (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) – Вектор-бест (Россия).

Результаты. Установлено, что курс заместительной сурфактант-терапии при гормонально-зависимой бронхиальной астме приводит к снижению в кровотоке уровня HSP-D и не влияет на концентрацию исследованных цитокинов, иммуноглобулинов класса G и белка HSP-A.

Заключение. Курс заместительной терапии препаратом Сурфактант-БЛ у пациентов с гормонально-зависимой бронхиальной астмой, помимо улучшения клинического состояния и снижения дозы принимаемых кортикостероидов, сопровождается улучшением состояния альвеолокапиллярной мембраны и снижением ее порозности.

Ключевые слова: бронхиальная астма, легочный сурфактант, сурфактант-терапия, сурфактант-ассоциированные белки, цитокины, иммуноглобулины группы G.

¹ Bazarbanina E.A., ¹ Stepanova O.V., ² Lukyanov S.A., ² Shapovalov K.G., ³ Rosenberg O.A.
**INFLUENCE OF SURFACTANT THERAPY ON CONCENTRATION OF SURFACTANT-
 ASSOCIATED PROTEINS, CYTOKINES, AND IMMUNOGLOBULINS IN BLOOD OF
 PATIENTS SUFFERING FROM HORMONE-DEPENDENT BRONCHIAL ASTHMA**

¹ Regional Clinical Hospital, 672038, Chita, 7 Kokhanskogo str;

² Chita State Medical Academy, 672000, Chita, 39-a Gorky str/;

³ A.M. Granov Russian Research Center of Radiology

and Surgical Technology, 197758, St. Petersburg, Pesochny village, 7 Leningradskaya str.

The objective of the study. To assess influence of surfactant therapy, course on surfactant-associated proteins (HSP-A and HSP-D), some cytokines, and immunoglobulins G for patients with bronchial asthma.

Materials and methods. The authors conducted an experimental prospective study to assess influence of therapy course with Surfactant-BL (ООО Biosurf, Saint Petersburg, Russia) on dynamics of surfactant-associated proteins, some cytokines, and immunoglobulins G in blood for 28 patients of both sexes with par-

tially controlled and uncontrolled severe asthma treated with corticosteroids. Used for this methods of ELISA and gas chromatography, the blood concentration of surfactant-associated proteins (HSP-A, HSP-D) was estimated using reagents: Human surfactant protein A ELISA, Human surfactant protein D ELISA from Bio Vendor - Laboratorní medicína (s. Czech Republic); cytokines (IL-10, IL-13, IL-23, TNF α) reagents SEA060Hu 96 (For Interleukin 13 (IL13)), SEA384Hu 96 (For Interleukin 23 (IL23)) of Cloud-clone Corp, USA; and immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) reagents D-4903 Hunt –IgG - express - best, Vectorbest JSC, Russian Federation.

Results. It has been established that a course of surfactant replacement therapy for hormone-dependent bronchial asthma leads to a decrease in the level of HSP-D in the bloodstream and does not affect the concentration of the studied cytokines, immunoglobulins G, and HSP-A protein.

Conclusion The course of substitution therapy with Surfactant-BL in patients with hormone-dependent bronchial asthma, in addition to improving the clinical condition and reducing the dose of corticosteroids, is accompanied by an improvement in the state of the alveolocapillary membrane and a decrease in its porosity.

Key words: bronchial asthma, pulmonary surfactant, surfactant therapy.

Известно, что при бронхиальной астме (БА) происходят изменения в системе легочного сурфактанта, связанные с активностью воспалительного процесса бронхов и давностью течения заболевания [1, 2]. В патогенезе эозинофильной БА важнейшую роль играет хронический воспалительный процесс в бронхах, обратимая бронхообструкция и гиперчувствительность бронхов. Эозинофилия играет важную роль в патогенезе БА, а также выброс медиаторов воспаления. При рефрактерной к стероидам БА антитела к IL-5 уменьшают воспалительный процесс, указывая на роль эозинофилии и IL-5 [3]. Установлено, что возникновение и развитие бронхиальной астмы сопровождается активацией свободно-радикальных процессов в легких [4]. Активные метаболиты кислорода активируют фагоцитирующие клетки и вызывают развитие «респираторного взрыва». Избыточная продукция активных форм кислорода способствует развитию оксидативного стресса, который сопровождается бронхоспазмом и хроническим воспалением в бронхах [4, 5]. При длительном течении БА, частых обострениях с необходимостью длительного приема системных глюкокортикостероидов (ГКС) происходит существенное снижение синтеза и содержания легочного сурфактанта [6]. Недостаточность локальной продукции сурфактанта неизбежно сопровождается депрессией локальных механизмов резистентности, что может быть важным звеном патогенеза пролонгированного хронического аллергического воспаления. Многосторонние функции легочного сурфактанта, в частности, обеспечения врожденного и приобретенного локального иммунитета легочной ткани, реализуются, в том числе, большими гидрофильными сурфактант-ассоциированными белками HSP-A и HSP-D. Поэтому представляется оправданным попытка влияния на воспалительный процесс в бронхах заместительной сурфактант-терапии [7]. Клинические эффекты сурфактант-терапии БА и влияние на параметры функции внешнего дыхания нами были ранее показаны [6], однако роль в этих положительных клинических эффектах содержания сурфактант-ассоциированных белков, цитокинов и иммуноглобулинов не изучена.

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния курса сурфактант-терапии у больных БА на содержание в крови сурфактант-ассоциированных белков (HSP-A и HSP-D), некоторых цитокинов и иммуноглобулинов класса G.

Материалы и методы. Исследование выполнено у 28 пациентов обоего пола с частично контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмой тяжелого течения, в возрасте от 18 до 70 лет, получающих кортикостероидную терапию по поводу БА, на базе НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Чита-2» (директор – П.В. Громов). Работа проводилась на основе одобрения локального этического комитета ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» и утвержденных протоколов. Диагноз выставлялся в соответствии с принятыми рекомендациями GINA 2016 года.

Исходно пациенты получали комплексную базовую терапию БА, включая антибактериальные препараты в периоды обострения, короткие курсы системных пероральных и/или парентеральных ГКС. После компенсации течения БА больные переходили на ингаляцион-

ные формы, либо короткие/длительные бронходилататоры или комбинированные ингаляторы в сроки от 12 месяцев до 12 лет. При включении в исследование пациентам проводили курс ингаляций препарата сурфактант-БЛ (ООО «Биосурф», Санкт-Петербург, Россия) в дозе 25 мг на ингаляцию, с помощью компрессорного небулайзера Boreal (Италия). Каждому пациенту выдавалась схема использования препарата. Сурфактант-БЛ принимали ежедневно в течение первых 7 дней исследования, а затем в дни 10, 13, 16, 19, 22, 26, 30, 35, 41, 47, 54, 61, 68 и 70 (в общей сложности 21 ингаляция). Пациентам выполнялся контроль необходимых показателей в течение всего периода исследования при 9 посещениях в следующие дни 1 (V1), 8 (V2), 15 (V3), 29 (V4), 41 (V5), 70 (V6), 160 (V7), 250 (V8) и 340 (V9). Во время визитов V1 и V7 проводился забор венозной крови.

С помощью метода ИФА и газовой хроматографии оценивалась концентрация в крови сурфактант-ассоциированных белков (HSP-A, HSP-D) реактивами фирмы Bio Vendor - Laboratorní medicína a.s. (Czech Republic), цитокинов (IL-10, IL-13, IL-23, TNF α) - Cloud-clone Corp (USA) и иммуноглобулинов (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) – Вектор-бест (Россия).

Группу контроля составили 15 человек соответствующей возрастной группы без выявленной сопутствующей патологии дыхательной и сердечно-сосудистой систем.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения «Statistica» (v6.0, StatSoft, США). Для оценки показателей применялась непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что у больных бронхиальной астмой при длительном приеме глюкокортикостероидов в крови регистрируются выраженные отклонения уровня сурфактант-ассоциированного белка HSP-A и IgG4 относительно группы контроля (табл. 1). Так, концентрация белка HSP-A в крови пациентов была выше в 1,7 раза ($p < 0,05$), что может быть связано с повышенной проницаемостью альвеолокапиллярной мембраны.

Таблица 1

Динамика сурфактант-ассоциированных белков
на фоне заместительной терапии препаратом сурфактанта (M \pm SD)

Показатель	Контроль (n=14)	До лечения (n=28)	После лечения (n=28)
HSP-A	390,0 \pm 99,5	646,3 \pm 81,8 $p < 0,05$	667,6 \pm 134,3 $p < 0,05$ $p1 > 0,05$
HSP-D	85,0 \pm 8,12	88,6 \pm 19,5 $p > 0,05$	38,6 \pm 4,9 $p < 0,05$ $p1 < 0,05$

p – уровень значимости различий относительно группы контроля;

p1 – уровень значимости различий между показателями «До лечения» и «После лечения»

Одновременно выявлено, что уровень IgG4 в крови больных с астмой ниже почти в 15 раз по отношению к группе контроля (табл. 3). При этом проведение заместительной сурфактант-терапии не сказывается существенно на содержании HSP-A и IgG4 ($p1 > 0,05$) (табл. 1). Также не выявлено отклонений уровня исследованных цитокинов в крови больных с астмой как относительно контроля, так и на фоне курса ингаляций препарата сурфактанта (табл. 2).

Таблица 2.

Динамика некоторых цитокинов на фоне заместительной терапии препаратом сурфактанта
(M \pm SD)

Показатель	Контроль (n=14)	До лечения (n=28)	После лечения (n=28)
IL-10	0,4 \pm 0,21	1,2 \pm 0,54 $p > 0,05$	1,1 \pm 0,62 $p > 0,05$ $p1 > 0,05$

IL-13	4,1±1,84	1,7±0,6 p>0,05	2,0±1,6 p>0,05 p1>0,05
IL-23	3,2±1,41	1,1±0,5 p>0,05	0,9±0,4 p>0,05 p1>0,05
TNFα	0,80±0,04	0,86±0,26 p>0,05	0,83±0,22 p>0,05 p1>0,05

p – уровень значимости различий относительно группы контроля;

p1 – уровень значимости различий между показателями «До лечения» и «После лечения»

Таблица 3.

Динамика иммуноглобулинов на фоне заместительной терапии препаратом сурфактанта (M±SD)

Показатель	Контроль (n=14)	До лечения (n=28)	После лечения (n=28)
IgG1	6,10±0,54	3,63±1,90 p>0,05	4,60±3,04 p>0,05 p1>0,05
IgG2	4,70±0,30	4,60±1,72 p>0,05	5,60±1,80 p>0,05 p1>0,05
IgG3	1,00±0,06	0,90±0,38 p>0,05	1,06±0,42 p>0,05 p1>0,05
IgG4	6,00±0,18	0,41±0,30 p<0,05	0,50±0,28 p<0,05 p1>0,05

p – уровень значимости различий относительно группы контроля;

p1 – уровень значимости различий между показателями «До лечения» и «После лечения»

Примечательно, что содержание HSP-D в крови пациентов с бронхиальной астмой до лечения препаратом сурфактанта не отличается от группы контроля, а после его уровень падает в 2,2 раза (p<0,05) (табл. 1).

Обсуждение. Ранее нами показано, что реализация курса заместительной сурфактант-терапии по вышеизложенному протоколу приводит к достоверной положительной динамике клинического течения БА [8, 9]. Кроме того, пациентам удается снизить дозу принимаемых глюкокортикостероидов. В основе таких сдвигов, вероятнее всего, находится механизм преодоления относительной недостаточности локальной продукции сурфактанта клетками Клара в легочной ткани, который формируется в результате длительной гормонотерапии, а также купирование локального воспаления на уровне альвеолокапиллярной мембраны. Тем не менее, динамику уровня HSP-D в системном кровотоке возможно объяснить с нескольких позиций. По нашему мнению, его концентрация в крови является отражением нескольких процессов: дозо-зависимым результатом резорбции локально продуцируемых белков, степени проницаемости альвеолокапиллярной мембраны на фоне длительного воспаления, несостоятельности локальных механизмов резистентности и их ауторегуляции.

На фоне проведенного курса заместительной терапии препаратом сурфактанта у больных с бронхиальной астмой регистрируется снижение концентрации HSP-D. Этот белок обладает прямым противомикробным эффектом, способностью подавлять продукцию иммуноглобулинов и цитотоксичность лимфоцитов, а также ингибирует стимулированное эндотоксинами освобождение ряда цитокинов из макрофагов (TNFα, IL-1, IL-6 и пр.) [10]. Известно, что HSP-A и HSP-D участвуют в опсонизации различных микроорганизмов, модулируют фагоцитоз, хемотаксис и оксидативное разрушение макрофагов [11]. В целом легочный

сурфактант, и прежде всего гидрофильные сурфактант-ассоциированные белки HSP-A и HSP-D оказывают противовоспалительный эффект на легочную среду, путем связывания бактериальных токсинов и активных форм кислорода [12].

Обнаружение компонентов сурфактанта в плазме крови больных БА может быть связано с повышенной порозностью альвеолокапиллярного барьера и поступлением этих соединений в системный кровоток [13]. Этот процесс «вымывания» сурфактанта из альвеол в капиллярное русло может потенцироваться под влиянием хронического воспаления в дыхательных путях. Судя по современным представлениям о функциях сурфактант-ассоциированного белка D, можно предположить, что падение его уровня после лечения больных указывает на снижение степени повреждения легких. Кроме того, сам HSP-D может являться агентом воздействия на патогенетические звенья воспалительной реакции при гормонально-зависимой БА.

Выводы:

1. Установлено, что ингаляции препарата Сурфактант-БЛ пациентам с гормонально-зависимой бронхиальной астмой приводят к снижению уровня HSP-D в сыворотке крови на 56%.
2. Обнаружено, что включение в схему лечения пациентов с гормонально-зависимой бронхиальной астмой сурфактант-заместительной терапии не влияет на уровень цитокинов (IL-10, IL-13, IL-23, TNF α) и иммуноглобулинов (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Список литературы:

1. Cheng G., Ueda T., Sugiyma K., Toda M., Fukuda T. Compositional and functional changes of pulmonary surfactant in a guinea-pig model of chronic asthma. *Respiratory Medicine*. 2001. 95. 180-186. doi:10.1053/rmed.2000.1012.
2. Devendra G., Spragg R. G. Lung surfactant in subacute pulmonary disease. *Respir. Res.* 2002. 3. 1930. <http://dx.doi.org/10.1186/rr168>. PMID: 11980588.
3. Анаев Э.Х., Федорченко К.Ю., Кушаева М.Э. и др. Диагностика заболеваний легких на основе протеомного анализа конденсата выдыхаемого воздуха. *Пульмонология*. 2017. 27 (2). 187-197. doi.org/10.18093/0869-0189-2017-27-2-187-197.
4. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита. *Редокс-наука*. 2007. - Режим доступа: <http://redox.ru/science/7815>.
5. Ерохин В.В., Лепеха Л.Н., Ерохина М.В., Ловачева О.В. Сурфактантная система при туберкулезе лёгких. Российская академия медицинских наук ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза». Москва: 2013. 265 с.
6. Rosenberg O.A., Lebedeva E.S., Loshakova L.V. et al. Influence of Long-Term Inhaled Glucocorticoids on the Lung Surfactant Phospholipid Levels in Rats. *International Journal of Biomedicine* 2016. 6 (3). 167-169. doi: 10.21103/Article6(3)_OA1.
7. Clark H., Reid K. Structural requirements for SP-D function in vitro and in vivo: therapeutic potential of recombinant SP-D. *Immunobiology*. 2002. 4. 61-64.
8. Лещенко И.В., Баранова И.И. Биомаркеры воспаления при хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология*. 2012. 2. 108-117.
9. Stepanova O.V., Akulova E.A., Kochneva A.A. et al. Influence of Natural Lung Surfactant Inhalations on Clinical Symptoms and Pulmonary Function Parameters in Patients with Bronchial Asthma. *Communication 1. International Journal of Biomedicine* 2016. 6 (4). 255-258.
10. Nkadi P.O., Merritt T.A. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease. *Mol. Genet. Metab.* 2009. 2. 95-101.
11. van Iwaarden F.J., van Golde L.M.J. Pulmonary surfactant and lung defense. In: Robertson B., Taeusch H.W. (editors). *Surfactant therapy for lung disease. Lung biology in health and disease*. New York: Marcel Dekker Inc. 1995. 75-84.

12. Рывкин А.И., Глазова Т.Г., Побединская Н.С., Ларюшкина Р.М., Решетова Т.Г. Патогенетические механизмы ремоделирования бронхов при бронхиальной астме у детей. Медицинский альманах 2017. 2 (47). 56-60.
13. Баутин А.Е., Солнцев В.Н., Наумов А.Б., Гарифзянов А.Ф., Валькович А.А., Осовских В.В., Волчков В.А., Розенберг О.А. Изменение проницаемости альвеолокапиллярной мембраны и состояния комплекса лёгочного сурфактанта во время операций на сердце и аорте. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2010. 7 (5). 11-17.

References:

1. Cheng G., Ueda T., Sugiyma K., Toda M., Fukuda T. Compositional and functional changes of pulmonary surfactant in a guinea-pig model of chronic asthma. *Respiratory Medicine*. 2001. 95. 180-186. doi:10.1053/rmed.2000.1012.
2. Devendra G., Spragg R. G. Lung surfactant in subacute pulmonary disease. *Respir. Res.* 2002. 3. 1930. <http://dx.doi.org/10.1186/rr168>. PMID: 11980588.
3. Anaev E.H., Fedorchenko K.YU., Kushaeva M.E. et al. Diagnosis of lung diseases based on proteomic analysis of exhaled breath condensate. *Pul'monologiya*. 2017. 27 (2). 187-197. doi.org/10.18093/0869-0189-2017-27-2-187-197. in Russian.
4. Kulinskij V.I. Active forms of oxygen and oxidative modification of macromolecules: benefits, harms and protection. *Redoks-nauka*. 2007. - Available at: <http://redox.ru/science/7815>. in Russian.
5. Erohin V.V., Lepekha L.N., Erohina M.V., Lovacheva O.V. Surfactant system for pulmonary tuberculosis. Russian Academy of Medical Sciences Federal State Budgetary Institution Central Research Institute of Tuberculosis. Moscow. 2013. 265 p. in Russian.
6. Rosenberg O.A., Lebedeva E.S., Loshakova L.V. et al. Influence of Long-Term Inhaled Glucocorticoids on the Lung Surfactant Phospholipid Levels in Rats. *International Journal of Biomedicine* 2016. 6 (3). 167-169. doi: 10.21103/Article6 (3)_OA1.
7. Clark H., Reid K. Structural requirements for SP-D function in vitro and in vivo: therapeutic potential of recombinant SP-D. *Immunobiology*. 2002. 4. 61-64.
8. Leshchenko I.V., Baranova I.I. Inflammation biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2012. 2. 108-117. in Russian.
9. Stepanova O.V., Akulova E.A., Kochneva A.A. et al. Influence of Natural Lung Surfactant Inhalations on Clinical Symptoms and Pulmonary Function Parameters in Patients with Bronchial Asthma. Communication 1. *International Journal of Biomedicine* 2016. 6 (4). 255-258.
10. Nkadi P.O., Merritt T.A. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease. *Mol. Genet. Metab.* 2009. 2. 95-101.
11. van Iwaarden F.J., van Golde L.M.J. Pulmonary surfactant and lung defense. In: Robertson B., Taeusch H.W. (editors). *Surfactant therapy for lung disease. Lung biology in health and disease*. New York: Marcel Dekker Inc. 1995. 75-84.
12. Ryvkin A.I., Glazova T.G., Pobedinskaya N.S., Laryushkina R.M., Reshetova T.G. Pathogenetic mechanisms of bronchial remodeling in children with bronchial asthma. *Medicinskij al'manah*. 2017. 2 (47). 56-60. in Russian.
13. Bautin A.E., Solncev V.N., Naumov A.B., Garifzyanov A.F., Val'kovich A.A., Osovskih V.V., Volchikov V.A., Rozenberg O.A. Changes in the permeability of the alveolocapillary membrane and the state of the pulmonary surfactant complex during operations on the heart and aorta. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2010. 7 (5). 11-17. in Russian.