

*На правах рукописи*

**ДЕМЬЯНЕНКО Наталья Геннадьевна**

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВПЕРВЫЕ  
ВЫЯВЛЕННОГО И РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО САРКОИДОЗА**

14.01.25 – Пульмонология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор **Шмелев Евгений Иванович**

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор **Лепеха Лариса Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Зайцев Андрей Алексеевич**, доктор медицинских наук, доцент, главный пульмонолог Федерального государственного казённого учреждения "Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко"

**Терпигоров Станислав Анатольевич**, доктор медицинских наук, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им.М.Ф. Владимирского», заведующий отделением профпатологии и врачебно-трудовой экспертизы

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «27» июня 2017 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.052.01 при ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» по адресу: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (107564, г. Москва, Яузская аллея, д.2; <http://www.critub.ru>)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук

**Юхименко Наталья Валентиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Саркоидоз органов дыхания (СОД) одно из наиболее распространенных интерстициальных заболеваний легких неустановленной природы [Чучалин А.Г., 2007]. Известны различные варианты течения СОД: от латентно протекающего с самоизлечением до рецидивирующего, приводящего к инвалидизации, а порой и смерти [Илькович М.М., 2005]. У впервые выявленных больных СОД имеет характерные клинико-рентгенологические и морфологические проявления, соответствующие острому, подострому и хроническому течению воспалительной реакции. Рецидивирующий вариант заболевания может значительно отличаться по своим клиническим признакам от впервые выявленного СОД, поскольку рецидив СОД развивается на фоне уже имеющих изменений легких и требует применения дополнительных методов диагностики [Илькович М.М., 2005; Шмелев Е.И., 2003]. Ключевая роль в воспалении и формировании гранулем при саркоидозе принадлежит макрофагам [Лепеха Л.Н., 1995; Николаева Г.М., 2004]. Они могут различаться по структурно-функциональному состоянию, запускающих адаптивный иммунный ответ по клеточному (Th1) или гуморальному (Th2) типу, т. е. иметь M1 или M2 фенотип соответственно [Лямина С.В., 2013; Moller D. R. 1999; Zeida M, 2007 ].

Для изучения мононуклеарных фагоцитов легкого используется материал бронхоальвеолярного лаважа, зарекомендовавшего себя как адекватный метод дифференциальной диагностики заболеваний органов дыхания, в т. ч. саркоидоза [Лепеха Л.Н., 1995; Николаева Г.М., 2004; Филипов В.П., 1996]. В то же время «поведение» макрофагов при различных вариантах СОД практически не изучено, что является важным шагом в понимании сущности этого заболевания. Установлено, что у впервые выявленных больных СОД, не получавших кортикостероидную терапию, формируется M1 фенотип альвеолярных макрофагов (AM), повышается выработка провоспалительных цитокинов [Prasse A, 2000; Zissel G, 2007]. Учитывая высокую фенотипическую пластичность мононуклеарных фагоцитов легкого, представляется диагностически важным определение уровня различных маркеров фенотипа AM не только при впервые выявленном СОД, но и при рецидивирующем течении заболевания, что до настоящего времени не проводилось. Необходимо также изучить гетерогенность AM и определить макрофагальную формулу (МФ) бронхоальвеолярного смыва (БАС) при этом варианте заболевания, что в известной литературе не нашло отражения. Важное прогностическое значение будет иметь сопоставление макрофагального и цитокинового спектров БАС при различных вариантах СОД. Это раскрывает новые возможности и позволит сформировать современный подход к

лабораторной диагностике заболевания. Сравнительный анализ структурных особенностей АМ и цитокинового спектра БАС при впервые выявленном и рецидивирующем СОД, поможет совершенствовать дифференциальную диагностику вариантов развития и выбор лечебной тактики заболевания.

### **Степень разработанности проблемы**

Несмотря на актуальность проблемы своевременной диагностики и лечения СОД, оценка состояния некоторых его вариантов остается мало изученной. В частности, отмечается недостаточность данных о клинико-функциональных особенностях и изменениях иммунитета при рецидивирующем варианте заболевания, который развивается на фоне уже имеющихся изменений в легких [Илькович М.М., 2005; Шмелев Е.И., 2003]. Поскольку ключевая роль в развитии гранулематозной реакции принадлежит макрофагам, запускающим адаптивный иммунный ответ по клеточному или гуморальному типу, оценка их структурно-функционального состояния является наиболее перспективной для разработки новых подходов к диагностике различных вариантов СОД [Ерохин В.В., 2000; Лямина С.В., 2013; Moller D. R. 1999; Zeida M, 2007].

### **Цель исследования**

Изучить клинико-рентгенологические проявления, структурно-функциональные особенности и цитокиновый спектр макрофагов бронхоальвеолярного смыва у пациентов с впервые выявленным и рецидивирующим саркоидозом органов дыхания.

### **Задачи**

1. Изучить особенности клинических и рентгенологических проявлений у пациентов с впервые выявленным и рецидивирующим СОД.
2. Сравнить функциональные показатели у пациентов с различным течением СОД.
3. Проанализировать возможные факторы агрессии, предшествующие возникновению и/или рецидиву заболевания.
4. Изучить структурно-функциональные особенности и определить макрофагальную формулу бронхоальвеолярного смыва у пациентов с впервые выявленным и рецидивирующим СОД.

5. Изучить особенности секреторной функции и определить цитокиновый спектр макрофагов при различных вариантах СОД.

### **Научная новизна исследования**

1. Впервые дана сравнительная клиническая характеристика, определены частота внелегочных проявлений и рентгенологические особенности при рецидивирующем варианте течения СОД по сравнению с впервые выявленным.
2. Установлены наиболее вероятные причины возникновения рецидива заболевания, среди которых первостепенное значение имеют противовоспалительная терапия плаквенилом и/или ранняя отмена системных глюкокортикостероидов (СГКС).
3. В результате светооптического и электронно-микроскопического исследований макрофагальных элементов бронхоальвеолярного смыва выявлены особенности макрофагальной формулы при различном течении саркоидоза.
4. Установлена корреляция макрофагального и цитокинового спектра бронхоальвеолярного смыва при впервые выявленном и рецидивирующем СОД, показаны новые возможности адекватной оценки разных вариантов заболевания с учетом структурно-функционального состояния легочных макрофагов, имеющих M1 и/или M2 фенотипы соответственно.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты проведенного исследования расширяют представления о состоянии респираторных отделов легких и необходимости оценки структурно-функционального статуса его макрофагальных элементов. Это, в первую очередь, относится к рецидивирующему течению заболевания, которое развивается на фоне уже имеющих изменений в легочной ткани и представляет наибольшие трудности для своевременной верификации. Выявленная более яркая клинико-рентгенологическая симптоматика у пациентов с этим вариантом течения процесса может быть использовано в диагностике и оценке эффективности терапии, тогда как спирометрические показатели недостаточно информативны. Выявленная корреляция между изменениями макрофагального и цитокинового спектра БАС дает новые возможности эффективной лабораторной диагностики впервые выявленного и рецидивирующего СОД.

## **Методология и методы диссертации**

Диссертационная работа представляет собой исследование, в котором решается задача повышения качества и медицинской помощи пациентам с разными вариантами течения СОД за счет разработки новых диагностических подходов.

Объектом исследования являются больные СОД. Предметом исследования послужили клиничко-рентгенологические, функциональные. Иммунологические и цитологические показатели больных с разными вариантами течения заболевания. Гипотеза исследования представляет разный характер изменений в РО при впервые выявленном и рецидивирующем течении заболевания. Она должна найти свое отражение не только в клиничко-рентгенологических особенностях разных вариантов СОД, но и в цитологических и иммунологических лабораторных показателях с использованием такого информативного клинического материала как БАС.

Для решения поставленных задач были использованы эмпирические методы (наблюдение, описание) и универсальные методы научного познания (анализ, синтез, индукция, дедукция).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Для пациентов с рецидивирующим течением СОД характерна более яркая клиничко-рентгенологическая картина заболевания и высокая частота внелегочных проявлений по сравнению с впервые выявленным.
2. Предшествующие причины развития разных вариантов СОД различны: при впервые выявленном процессе важное значение имеют стрессовые ситуации и чрезмерная инсоляция. При рецидивирующем течении – неадекватная противовоспалительная терапия (плаквенил) и/или ранняя отмена системных СГКС.
3. При впервые выявленном СОД в БАС достоверно повышается концентрация провоспалительных цитокинов IL-2, IL-8, IL-1 $\beta$ . Это коррелирует с восьмикратным увеличением в составе МФ макрофагов с признаками выраженной секреторной активности и зрелых эпителиальных клеток (ЭК), что при этом варианте заболевания указывает на преобладание в легких макрофагов M1 фенотипа.
4. При рецидивирующем СОД, в отличие от впервые выявленного, происходит развитие не только секреторной, но и фагоцитарной функции макрофагов. В составе МФ достоверно повышается содержание клеток не только с признаками секреции, но и фагоцитоза. Это

коррелирует с появлением в БАС противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-5 и указывает на наличие макрофагов M1/M2, то есть смешанного фенотипа, при этом варианте заболевания.

### **Степень достоверности и апробация диссертационной работы**

Достоверность полученных результатов обеспечивается глубоким анализом научной литературы по теме исследования, достаточным объемом проведенного исследования, использованием методик, адекватных поставленным задачам с применением современных методов статистического анализа. Научные выводы обоснованы, вытекают из поставленных задач. Достоверность первичных материалов подтверждена и не вызывает сомнения.

Апробация диссертационной работы проведена на заседании отделов дифференциальной диагностики туберкулеза и экстракорпоральных методов лечения, клинико-диагностического отдела, отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, иммунологии и научно-организационного отделов. Материалы диссертации доложены на 23 Национальном конгрессе по болезням органов дыхания г. Казань 2013 год, 24 Национальном конгрессе по болезням органов дыхания г. Москва 2014 г., конференциях молодых ученых с международным участием в ФГБНУ «ЦНИИТ» г. Москва в 2013, 2014 и 2015 годах, конгрессе ERS в Барселоне в 2013 году.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Содержание диссертации соответствует специальности 14.01.25- «Пульмонология» (Медицинские науки) и области исследования: п.2, п.5.

### **Внедрение в практику результатов исследования**

Материалы диссертационного исследования внедрены в практику терапевтических отделений отдела дифференциальной диагностики туберкулеза и экстракорпоральных методов лечения ФГБНУ «ЦНИИТ», а также включены в цикл лекций отделения телемедицины и организации последипломного обучения ФГБНУ «ЦНИИТ».

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 2 работы в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 112 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 24 рисунками. Библиография содержит 138 источников, в том числе 38 отечественных и 100 зарубежных авторов.

### **Материалы и методы**

Всего было обследовано 120 пациентов с морфологически верифицированным впервые выявленным и рецидивирующим саркоидозом, находящихся на обследовании и лечении в ФГБНУ «ЦНИИТ» с 2010 по 2013 год. Данные пациенты были разделены на две группы: 60 человек с впервые выявленным СОД и 60 пациентов с рецидивирующим течением СОД.

Среди пациентов обеих групп преобладали женщины. В группе впервые выявленного СОД их число составило 37 человек (61,6%), мужчин 23 человека (38,3%). Средний возраст пациентов составил  $37,3 \pm 1,6$  лет. В группе рецидивирующего СОД женщин было 41 человек (68,3%), мужчин 19 человек (31,6%). Средний возраст составил  $43,9 \pm 1,5$  лет. Для оценки уровня цитокинов была сформирована контрольная группа из практически здоровых 19 человек независимо от статуса курения [Лямина С.В, 2013]. В данной группе количество женщин было 6 человек (31,6%), мужчин 13 человек (68,4%). Средний возраст составил  $42 \pm 3,7$  лет. Также проводилось бронхологическое обследование со взятием БАС и последующим цитологическим и иммунологическим его изучением. Данное обследование у пациентов с впервые выявленным СОД было проведено у 38 человек, у пациентов с рецидивирующим СОД – у 34 человек. В объем цитологического исследования входило изучение цитограммы БАС, подсчет макрофагальной формулы с изучением процентного содержания молодых и зрелых макрофагов с разным фенотипом, проводился ультраструктурный анализ данных клеток. Оценка уровня про- и противовоспалительных цитокинов в БАС методом проточной цитометрии проводилась на базе ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

### **Физикальное обследование**

При сборе анамнеза у пациентов особое внимание уделялось оценке возможных факторов экологического воздействия, а также предполагаемых причинах рецидива саркоидоза. К этому относились такие факторы как: значительная стрессовая ситуация, избыточная инсоляция, перенесенная вирусная инфекция, обострение сопутствующей



патологии, отсутствие лечения, ранняя отмена кортикостероидной терапии. Последние 3 возможных причины относили к пациентам с рецидивирующим течением саркоидоза. Далее проводили осмотр пациентов с целью выявления системных проявлений саркоидоза. Детально оценивали жалобы пациентов: одышка, кашель, дискомфорт в грудной клетке, слабость.

### **Функциональные методы обследования**

Всем пациентам проводилась спирография, бодиплетизмография с исследованием диффузионной способности легких для окиси углерода методом единичного вдоха, определение коэффициента диффузии и газов артериализованной капиллярной крови. Вентиляционная функция легких оценивалась показателями жизненной емкости легких (ЖЕЛ), форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объемом форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1), максимальными скоростями форсированного выдоха при выдохе 25%, 50% и 75% ЖЕЛ (МОС 25, МОС 50 и МОС 75), газы крови – напряжением кислорода и двуокиси углерода в артериализованной капиллярной крови ( $P_{aO_2}$ ,  $P_{aCO_2}$ ), диффузионная способность легких для окиси углерода методом единичного вдоха (DLCO – SB) и коэффициент диффузии (DLCO-VA). Границей нормальных показателей ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ1, DLCO-SB и DLCO-VA считали 80% от должной величины. МОС25, МОС50 и МОС 75 – 60% от должной величины.  $P_{aO_2}$  – 80 мм. рт. ст.,  $P_{aCO_2}$  – 35-45 мм. рт. ст.

### **Бронхологические методы обследования**

Бронхологическое исследование включало в себя осмотр слизистой оболочки бронхиального дерева и проведение бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Для определения эндопульмональной цитогаммы БАС пропускали через марлевый фильтр, центрифугировали и затем промывали в двух сменах фосфатного буфера. Приготовленные цитологические препараты окрашивали по методу Романовского-Гимза. Подсчет производили не менее 500 клеток с использованием иммерсионного объектива. При этом учитывали: альвеолярные макрофаги (АМ), лимфоциты (Л), нейтрофилы (Н), эозинофилы (Э), базофилы (Б). При анализе эндопульмональной цитогаммы учитывались морфологически выраженные фазы воспаления, отражающие развитие в респираторных отделах лимфоцитарного альвеолита, гранулематоза и фиброза пациенты с впервые выявленным саркоидозом были разделены на 3 группы соответственно: с острым течением, подострым и хроническим течением.

Для пациентов с рецидивирующим течением заболевания морфологически характерно появление, на фоне фиброзных изменений паренхимы, признаков лимфоцитарного альвеолита и/или гранулематоза. Данная группа составила 34 человека. Полученные данные сравнивали с нормой.

У 72 пациентов с СОД и 19 человек из контрольной группы определяли МФ [Лепеха Л.Н., 1995, 2000; Николаева Г.М., 2004], для чего подсчитывали относительное процентное содержание молодых и зрелых макрофагов с разными структурно-функциональными характеристиками. Кроме того, проводили электронно-микроскопическое исследование БАС, для чего клеточный осадок фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере 0,1М (рН 7,2-7,4), дофиксировали 1% раствором OsO<sub>4</sub> и заключали в эпон-аралдит обычным способом. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM – 100В в межфакультетской лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова [ Лепеха Л.Н. 1995, 2000; Николаева Г.М. 2004].

Определение уровня цитокинов проводили методом проточной цитофлуориметрии (аппарат BeckmanCoulterFC500, США) наборами для мультиплексного определения 11 цитокинов (BMS810FF) человека. Анализ уровня цитокинов методом проточной цитометрии выполнен в соответствии с инструкциями производителя с учетом данных о чувствительности использованного набора в отношении исследуемых цитокинов: IL-1 $\beta$  – 5,2 пг/мл, IL-2 - 20,0 пг/мл, IL-4 - 15,7 пг/мл, IL-5 – 10,0 пг/мл, IL-6 - 0,8 пг/мл, IL-8 - 7,9 пг/мл, IL-10 – 1,5 пг/мл, IL-12 p70 - 11,6 пг/мл, IFN $\gamma$  – 2,2 пг/мл, TNF $\alpha$  – 17,5 пг/мл, TNF $\beta$  – 3,1 пг/мл.

### **Рентгенологические исследования**

Обследование включало традиционное рентгенологическое исследование, компьютерную томографию органов грудной клетки. Для этого использовали рентгеновский диагностический аппарат с томографической приставкой с системой автоматического уменьшения до минимума нерезкости фокуса, что позволяло получить изображение объекта высокого качества. Мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) проводили на аппарате «Siemens Somatom Emotion». Спиральное сканирование производили в краниокудальном направлении при задержанном дыхании больного. В группе с впервые выявленным саркоидозом исследование выполнено у 50 человек (83,3%). В группе с рецидивирующим течением у 44 человек (73,3%).

### Статистическая обработка результатов

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 10 для количественных и номинальных параметров. Для оценки вариационных рядов использовали описательную статистику с вычислением средней арифметической, стандартного отклонения, ошибки средней арифметической и медианы. Для номинальных признаков использовали вычисление долей и процентное соотношение. Далее проводился анализ достоверности различий с помощью проверки нулевой гипотезы. Целью было сравнение двух групп: впервые выявленного и рецидивирующего СОД. Нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась при значениях  $p < 0,05$ . Для оценки корреляционных зависимостей использовался непараметрический критерий Спирмена, что позволяло оценивать корреляционные связи вне зависимости от нормальности распределения полученных данных.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе пациентов с рецидивирующим течением СОД длительность заболевания составила от 1, 5 до 19 лет. При детальном опросе пациентов удалось установить четкую взаимосвязь между ухудшением состояния и вероятной причиной рецидива заболевания. Так, было установлено, что у 3 человек (5%) наиболее вероятной причиной стала чрезмерная инсоляция, сильная стрессовая ситуация у 2 пациентов (3,3%), ранняя отмена СГКС (терапия менее 6 месяцев), была у 18 пациентов (30%). У 22 пациентов (36,6%) вероятной причиной рецидива послужило неадекватно проведенное лечение, включающее в себя противовоспалительную терапию плаквенилом и витамином Е. Полное отсутствие лечения в течение 6 месяцев и более несмотря на гистологически верифицированный процесс, наблюдалось у 9 человек (15%). У 5 пациентов (8,3%) причина рецидива осталась не выяснена.

В группе впервые выявленного СОД при выяснении наиболее вероятных причин, предшествующих возникновению заболевания, удалось установить, что перед выявлением изменений в легких, либо появлением первых симптомов заболевания, у 21 человека (35%) наблюдалась выраженная стрессовая ситуация, 5 человек (8,3%) перенесли тяжелую ОРВИ, у 8 человек (13,3%) симптомы заболевания появились после длительного отдыха на солнце. У 26 человек (43,3% случаев) никакой взаимосвязи с заболеванием

установить не смогли. Жалобы и их сочетание в группе впервые выявленного и рецидивирующего СОД представлены в табл. 1.

**Таблица 1.** Сравнительная оценка жалоб и их сочетания в обеих группах

Жалобы	Рецидивирующий саркоидоз n = 60	Впервые выявленный саркоидоз n = 60
Жалоб нет	8 (13,3%)	13 (21,6%)
Одышка	12 (20%)	21 (35%)**
Кашель	2 (3,3%)	20 (33,3%)**
Кашель+одышка	7 (11,6%)	0*
Слабость	0	9 (15%)**
Синдром Лефгрена	0	2 (3,3%)
Кашель+слабость+одышка	13 (23,3%)	15 (25%)
Кашель+одышка+дискомфорт в грудной клетке	7 (11,6%)	0*
Одышка + дискомфорт в грудной клетке	4 (6,6%)	0
Кашель+одышка+слабость+дискомфорт в грудной клетке	7 (11,6%)	0*
Одышка+слабость +артралгии	3 (5%)	0

Примечание: «\*» -  $p < 0,05$ , «\*\*»-  $p < 0,01$  различия статистически достоверны в сравнении с группой больных с рецидивирующим течением саркоидоза.

Как видно из данной таблицы, для пациентов с рецидивирующим течением СОД, по сравнению с впервые выявленным характерна более яркая клиническая картина и сочетание различных жалоб.

Генерализация процесса у пациентов с рецидивирующим течением наблюдалась в 2 раза чаще, чем в группе с впервые выявленным саркоидозом (26,6% и 13,3% соответственно). Причем в каждой группе внелегочные проявления были одинаковыми. Так, поражение кожи у пациентов с рецидивирующим течением встречалось в 10% случаев, тогда как, у впервые выявленных пациентов в 3,3%. Самым частым системным проявлением в обеих группах было поражение периферических лимфатических узлов: в

группе рецидивов это наблюдалось в 13,3% случаев, в группе впервые выявленного саркоидоза в 8,3% (табл. 2). Гранулематозное поражение сердца в обеих группах встречалось достаточно редко (см. табл. 2).

**Таблица 2.** Внелегочные проявления различных вариантов саркоидоза.

Группы наблюдения	Всего	Из них с внелегочными проявлениями		
		Кожа	Периферические лимфатические узлы	Сердце
Рецидивирующий саркоидоз	n=60	6 (10%)	8 (13,3%)	2 (3,3%)
Впервые выявленный саркоидоз	n=60	2 (3,3%)	5 (8,3%)	1 (1,6%)

Нарушения показателей спирометрии наблюдаются при различных вариантах СОД. В обеих группах определялось снижение легочных объемов, нарушения газообменной функции и бронхиальной проводимости. Из них, статистически значимыми были выявлены нарушения бронхиальной проводимости МОС-75 и МОС -25.

В результате использования МСКТ в обеих группах признаками, отражающими активность патологического процесса у впервые выявленных больных явились внутригрудная аденопатия, очаговая диссеминация, матовое стекло, изменения интерстиция и плевры. Для рецидивирующего варианта СОД более характерными проявлениями было сочетание очаговой диссеминации с консолидацией, эмфизема, наличие бронхоэктазий и интерстициального фиброза ( табл. 3).

**Таблица 3.** Патологические признаки саркоидоза ВГЛУ и легких по данным традиционной рентгенографии и МСКТ (n=96)

Лучевые признаки	Впервые выявленный (n=50)				Рецидивирующий (n=44)			
	КТ		Рентгено- графия		КТ		Рентгено- графия	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Очаговая диссеминация	40	80%*	34	68%	26	59%	19	43,2%
Изменения интерстиция	34	68%	14	28%	34	77,3%	21	47,7%
Матовое стекло	28	56%*	8	16%	11	25%	7	15,9%
Консолидации	17	34%*	10	20%	34	77,3%	12	27,3%
Гиперплазия ВГЛУ	47	94%*	37	74%	23	52,3%	18	40,9%
Эмфизема	4	8%**	2	4%	37	84,1%	31	70,5%
Бронхоэктазии	5	10%**	3	6%	38	86,4%	27	61,4%
Изменения плевры	35	70%	16	32%	36	81,8%	22	50%
Интерстициальный фиброз	7	14%**	4	8%	44	100%	36	81,8%

Примечание: «\*» -  $p < 0,05$ , «\*\*»-  $p < 0,01$  - различия статистически достоверны в сравнении с группой больных с рецидивирующим течением саркоидоза.

Как показало наше исследование, у больных СОД, не только общее содержание, но и спектр клеточных элементов БАС варьируют в зависимости от варианта развития воспалительного процесса в респираторном отделе (РО) легких (табл. 4).

**Таблица 4.** Особенности эндопульмональной цитограммы БАС при разном течении СОД

Группы наблюдения	клеток в 1мл, $\times 10^6$ M $\pm$ m	клеточные элементы %			
		Макрофаги M $\pm$ m	Лимфоциты M $\pm$ m	Нейтрофилы M $\pm$ m	Эозинофил M $\pm$ m
Норма n=20	0,12 $\pm$ 0,09	81,02 $\pm$ 2,09	10,86 $\pm$ 3,91	3,93 $\pm$ 1,02	0,38 $\pm$ 0,24
Острое n=2	0,39 $\pm$ 0,12**	53,71 $\pm$ 2,59**	44,89 $\pm$ 2,34**	2,70 $\pm$ 2,46	0,98 $\pm$ 0,71
Подострое n=26	0,28 $\pm$ 0,15*	76,71 $\pm$ 3,08	23,39 $\pm$ 2,08*	1,46 $\pm$ 1,29	0,67 $\pm$ 0,59
Хроническое n=10	0,09 $\pm$ 0,02	79,40 $\pm$ 3,12	14,90 $\pm$ 2,22	7,96 $\pm$ 1,99*	0,98 $\pm$ 0,92
Рецидивирующее n=34	0,31 $\pm$ 0,19**	65,51 $\pm$ 2,89*	32,05 $\pm$ 2,73**	6,81 $\pm$ 1,89	1,05 $\pm$ 0,93

Разница достоверна по сравнению с контролем:\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ .

При острой форме заболевания число клеток в 1 мл смыва превышает контрольный уровень более чем в 3 раза. Это связано с притоком в РО мононуклеаров, и прежде всего, лимфоцитов, на что указывает высокое процентное содержание этих клеток в ЭЦ, где оно достигает 44,89 $\pm$ 2,34%. При подостром и рецидивирующем течении саркоидоза цитоз лаважа и содержание лимфоцитов в ЭЦ несколько ниже, по сравнению с его острым вариантом, но по-прежнему достоверно превышают контрольные значения.

В результате подсчета процентного содержания в популяции макрофагов БАС клеток с различными структурно-функциональными характеристиками удалось определить, как общие, так и отличительные ее особенности при впервые выявленном и рецидивирующем СОД. Характерно, что активация молодых макрофагов достоверно, по

сравнению с контролем, повышена, как при впервые выявленном, так и рецидивирующем саркоидозе (табл.5). Однако, при дальнейшем созревании макрофагов наблюдаются определенные расхождения в показателях МФ. Так, при впервые выявленном СОД относительное процентное содержание клеток с выраженной секреторной активностью более, чем в 8 раз превышает нормальный уровень ( $26,63 \pm 0,98\%$ , вместо  $3,30 \pm 0,15\%$ ), тогда как число фагоцитирующих – существенно не меняется. (см. табл. 5). У больных с рецидивирующим СОД, несмотря на то, что содержание секретирующих макрофагов в МФ остается достоверно высоким ( $12,13 \pm 2,23\%$ ), оно в 2 раза ниже, чем у больных с впервые выявленным СОД. Более того, дифференцировка и созревание молодых макрофагов происходит не только в сторону секреторной, но и фагоцитарной активности. На это указывает достоверное повышение в МФ числа фагоцитирующих макрофагов ( $44,52 \pm 1,02\%$ , вместо  $38,80 \pm 1,16\%$ ) и снижение содержания клеток со смешанной функцией ( $10,73 \pm 1,71\%$ , вместо  $21,00 \pm 1,12\%$ ).

**Таблица 5.** Особенности макрофагальной формулы БАС при различном течении саркоидоза

Различные фенотипы макрофагов	Группа сравнения (M±m) (контроль) n=20	Впервые выявленный саркоидоз (M±m) n=38	Рецидивирующий саркоидоз n=34 (M±m)
<u>Молодые:</u>			
1. неактивированные	21,90±1,04	12,73±2,09**	13,75±1,83**
2. активированные	15,00±0,97	20,11±1,83*	20,71±1,73*
<u>Зрелые:</u>			
3. фагоцитирующие	38,80±1,16	33,53±2,32	44,52±1,02*
4. секретирующие	3,30±0,15	26,63±0,98**	12,13±2,23**
5. со смешанной функцией	21,00±1,12	3,43±1,15**	10,73±1,71**

Разница достоверна по сравнению с контролем: \*-p< 0,05, \*\*-p< 0,01



Учитывая выявленные различия в характере макрофагальной реакции при впервые выявленном и рецидивирующем СОД, определенный интерес представляло исследование цитокинов, продуцируемых клетками БАС (среди которых преобладали макрофаги) и определяющих Т-хелпер 1 (Th-1) и Т-хелпер 2 (Th-2) вектор иммунного ответа. Как показало наше исследование цитокиновый спектр лаважа зависит от варианта течения СОД и имеет ряд показателей, не характерных для контрольной группы.

Как видно из таблицы 6, при впервые выявленном СОД кроме того наблюдается достоверное уменьшение показателей IL-4 и IL-5 ( $784,8 \pm 46,4$  пг/мл и  $961,8 \pm 241,8$  пг/мл вместо  $1084,5 \pm 121,2$  пг/мл и  $1454,6 \pm 108,3$  пг/мл соответственно), а при рецидивирующем – IL – 12p70 ( $522,5 \pm 26,1$  пг/мл вместо  $908,7 \pm 113,9$  пг/мл) (см. табл. 6). Характерную особенность впервые выявленного СОД составляет значительное повышение в лаваже IL-8 ( $2038,2 \pm 296,8$  пг/мл, вместо  $920,2 \pm 328,7$  пг/мл) и в меньшей степени IL-2 ( $647,1 \pm 33,1$  пг/мл вместо  $469,1 \pm 74,2$ , тогда как при рецидивирующем саркоидозе существенно не изменяются (см. табл.6, рис.1).

Характерной особенностью рецидивирующего СОД является значительное повышение в БАС содержания IL-4 и IL-5 ( $3798,0 \pm 512,7$  и  $2006,0 \pm 366,5$  пг/мл вместо  $1084,5 \pm 121,2$  и  $1454,6 \pm 108,3$  пг/мл соответственно), тогда как при впервые выявленном саркоидозе показатели этих цитокинов достоверно снижаются (см. табл. 6).

Таким образом, по содержанию интерлейкинов в БАЛ впервые выявленный СОД по отношению к контрольной группе характеризуется повышенным уровнем цитокинов, активизирующих функцию Th-1 лимфоцитов (IL -2) и нейтрофилов (IL -8) и снижением продукции цитокинов (IL-4 и IL -5), характерных для Th-2. Для впервые выявленного саркоидоза в отличие от рецидивирующего характерна активизация продукции ряда провоспалительных цитокинов (IL -12p70 и IL -1 $\beta$ ). Для обеих форм заболевания по отношению к контрольной группе характерно значительное снижение продукции INF- $\gamma$  (4,5-4,8 раза) и в TNF- $\beta$  (1,8-2,0 раза). При этом, рецидивирующий саркоидоз отличается от впервые выявленного и группы контроля значительным повышением содержания IL-4, IL-5 (в 3,5 и 1,4 раза, соответственно).

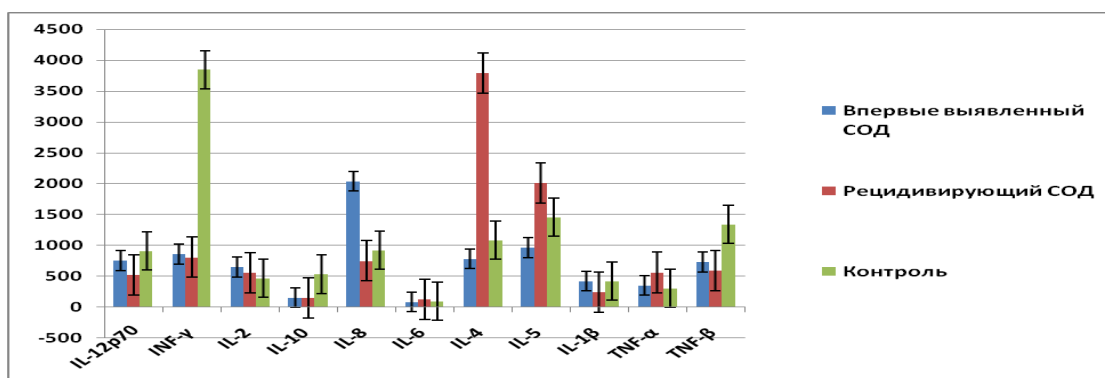


Рисунок 1. Сравнительный анализ уровня цитокинов в БАС (пг/мл) больных с разными течением СОД

**Таблица 6.** Сравнительный анализ содержания цитокинов в БАС(пг/мл) больных с разным формами СОД и контрольной группы.

Цитокины	Впервые выявленный СОД (M±m) n=20	Рецидивирующий СОД (M±m) n= 20	Контрольная группа (M±m) n= 19
IL-12p70	751,6 ± 38,9	522,5 ± 26,1*	908,7 ± 113,9
INF-γ	857,1 ± 98,8**	808,1 ± 175,8**	3846,8 ± 567,7
IL-2	647,1 ± 33,1*	555,8 ± 37,4	469,1 ± 74,2
IL-10	151,7 ± 12,4**	148,1 ± 9,6**	531,2 ± 61,6
IL-8	2038,2 ± 296,8**	748,3 ± 111,8	920,2 ± 328,7
IL-6	81,3 ± 14,9	124,5 ± 55,1	94,9 ± 29,6
IL-4	784,8 ± 46,4**	3798,0 ± 512,7**	1084,5 ± 121,2
IL-5	961,8 ± 241,8	2006,0 ± 366,5*	1454,6 ± 108,3
IL-1β	424,15 ± 42,6*	243,2 ± 20,6	267,8 ± 50,3
TNF-α	354,5 ± 134,8	560,8 ± 312,4*	305,2 ± 70,6
TNF-β	730,1 ± 31,5**	588,4 ± 16,9**	1340,3 ± 94,9

Разница достоверна по сравнению с контролем: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,001$ .

Таким образом, подсчет относительного процентного содержания макрофагов в БАС с разными структурно-функциональными характеристиками, удалось определить характерные особенности МФ для впервые выявленного и рецидивирующего СОД. Так, было установлено, что при впервые выявленном саркоидозе содержание в БАС макрофагов с ультраструктурными признаками выраженной секреторной активности и, особенно, эпителиоидных клеток, превышает нормальный уровень в 8 раз. Это согласуется с выявленным нами более высоким, чем в контроле, уровнем продукции ИЛ – 8, ИЛ – 2, ИЛ - 1 $\beta$ , что характерно для макрофагов фенотипа М-1 и составляет диагностическую особенность впервые выявленного СОД. При рецидивирующем течении заболевания дифференцировка и созревание молодых макрофагов очевидно происходит не только в сторону секреторной, но и фагоцитарной возможностей. На это указывает достоверное повышение в МФ числа клеток с ультраструктурными признаками фагоцитоза. Параллельно в БАС значительно повышается содержание ИЛ – 4 и ИЛ– 5, что более характерно для фенотипа макрофагов М-2, т. е. макрофагов с активацией фагоцитарной функции. Содержание макрофагов М-1 фенотипа также остается повышенным, что говорит о смешанной популяции макрофагов М1/М2 фенотипов при этом варианте СОД.

## ВЫВОДЫ

1. Для пациентов с рецидивирующим течением саркоидоза по сравнению с впервые выявленным характерна более яркая клиническая картина и сочетание различных жалоб: кашля и одышки (11,6%), к ним может присоединяться слабость (23,3%) или дискомфорт в грудной клетке (11,6%), а также все эти признаки могут наблюдаться одновременно (11,6%). Ведущими симптомами в группе впервые выявленного саркоидоза являются одышка (35%) или кашель (33,3%); в 21,6% случаев жалоб не отмечается.
2. При рецидивирующем течении саркоидоза по сравнению с впервые выявленным по данным МСКТ достоверно чаще встречаются интерстициальные фиброзные изменения различной степени выраженности, а также бронхоэктазии (86,4%), эмфизема (84,1%) и консолидации легочной ткани (77,3%). При впервые выявленном саркоидозе достоверно чаще встречаются изменения по типу «матового стекла» (56%), очаговая диссеминация (80%) и гиперплазия внутригрудных лимфатических узлов (94%).
3. Предшествующей причиной возникновения рецидива саркоидоза в 36,6% случаев является неадекватная противовоспалительная терапия с использованием

плаквенила, в 30% случаев - ранняя отмена СГКС. При впервые выявленном СОД возникновению заболевания в 35% случаев предшествовали стрессовые ситуации, в 13,3% случаев - чрезмерная инсоляция.

4. При впервые выявленном СОД достоверно чаще наблюдается снижение показателей МОС-75 ( $p < 0,05$ ), тогда как в группе с рецидивирующим течением саркоидоза достоверно снижены показатели МОС-25 ( $p < 0,05$ ). Показатели диффузионной способности и газов крови у этих групп больных достоверно не отличаются.
5. При впервые выявленном СОД в составе БАС наблюдается достоверное повышение концентрации провоспалительных цитокинов по сравнению с нормой ИЛ-2 ( $647,1 \pm 33,1$  пг/мл против  $469, \pm 74,2$ ), ИЛ-8, ИЛ-1 $\beta$  ( $2038,2 \pm 296,8$  пг/мл против  $920,2 \pm 328,7$ ), ИЛ-1 $\beta$  ( $424,15 \pm 42,6$  пг/мл против  $267,8 \pm 50,3$ ), тогда как при рецидивирующем варианте заболевания их содержание ниже, достоверно повышается уровень противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 ( $3798,0 \pm 512,7$  пг/мл против  $1084,5 \pm 121,2$ ) и ИЛ-5 ( $2006,0 \pm 366,5$  пг/мл против  $1454,6 \pm 108,3$ ).
6. При впервые выявленном СОД содержание в МФ БАС макрофагов с ультраструктурными признаками выраженной секреторной активности и, особенно, эпителиоидных клеток превышает нормальный уровень в 8 раз ( $26,63 \pm 0,98$  %, в норме  $3,30 \pm 0,15$  %). Это коррелирует с повышенным уровнем продукции ИЛ-8, ИЛ-2, ИЛ-1 $\beta$  и указывает на преобладание в легких макрофагов М-1 фенотипа.
7. При рецидивирующем СОД дифференцировка молодых макрофагов происходит не только в сторону развития секреторной, но и фагоцитарной их функции. В составе МФ БАС достоверно повышается относительное процентное содержание клеток с ультраструктурными признаками фагоцитоза ( $44,52 \pm 1,02$  %, в норме  $38,80 \pm 1,16$  %), увеличивается концентрация ИЛ-4 и ИЛ-5, что более характерно для макрофагов М-2 фенотипа. Содержание макрофагов М-1 фенотипа также остается повышенным ( $12,13 \pm 2,23$  %, в норме  $3,30 \pm 0,15$  %), что говорит о смешанной популяции макрофагов М1/М2 фенотипов при этом варианте СОД.

### **Практические рекомендации**

1. Для оценки вариантов течения СОД необходимо учитывать не только клинические проявления, но и рентгенологические особенности: при впервые выявленном саркоидозе преобладание гиперплазии внутригрудных лимфатических узлов,

очаговой диссеминации и симптома «матового стекла», при рецидивирующем течении преобладание интерстициального фиброза, легочной консолидации, бронхоэктазов, эмфиземы.

2. Для определения характера течения СОД рекомендовано использовать макрофагальную формулу бронхоальвеолярного смыва: при впервые выявленном саркоидозе повышается относительное процентное содержание секретирующих макрофагов, при рецидивирующем варианте течения появляются макрофаги с признаками фагоцитоза.
3. Для дифференциальной диагностики различных вариантов СОД рекомендовано использовать показатели цитокинового спектра БАС: при впервые выявленном заболевании повышается уровень провоспалительных цитокинов, при рецидивирующем варианте заболевания повышается уровень противовоспалительных цитокинов.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Романов, В.В. Влияние фенспирида на клиничко-иммунологический статус больных саркоидозом [Текст] / В.В. Романов, Н.Г. Демьяненко, С.В. Шелухина, Е.И. Шмелев // CONSILIUM MEDICUM - 2013. - № 11. - Москва. - С. 8-12.
2. Демьяненко, Н.Г. Динамическое исследование клиничко-иммунологических показателей у больных с впервые выявленным саркоидозом [Текст] / Н.Г. Демьяненко, С.В. Лямина, М.М. Авербах, В.В. Романов, И.Ю. Малышев, Е.И. Шмелев // Пульмонология - 2014. - № 1 – Москва - С. 61-66.
3. Демьяненко, Н.Г. Исследование цитокинового профиля при саркоидозе (предварительные результаты) [Текст] / Н.Г. Демьяненко // Очерки клиничко-пульмонологии. Избранные труды под ред. Шмелева Е.И. – 2012. - Атмосфера - С. 46-50.
4. Shelukhina, S.V. Clinical and immunological parameters in patients with newly diagnosed sarcoidosis [Текст] / S.V. Shelukhina, N.G. Demyanenko, Vladimir Romanov, M. Auerbach, E.I. Shmelev, O.V. Lovacheva //Материалы Конгресса ERS.- 2013.- Барселона. - P. 3817.
5. Demyanenco, N.G. Main features of cytokine profile in serum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with recurrent sarcoidosis [Текст] / N.G Demyanenco, S.V. Sheluhina, Vladimir Romanov, E.I. Shmelev // Материалы Конгресса ERS. - 2013.- Барселона. – P. 3818.

6. Lyamina, S. Imbalance of M1/M2 alveolar macrophages phenotype in pulmonary sarcoidosis [Текст] / S. Lyamina, N. Demyanenko, S. Shelukhina, O. Lovacheva, E. Shmelev, I. Malyshev // ERJ, September 2013.- Volume 42, supplement 57: P. 3464
7. Lyamina, S. Phenotypic plasticity of alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis [Текст] / S. Lyamina, N. Demyanenko, S. Shelukhina, O. Lovacheva, E. Shmelev // ERJ, September 2013. - Volume 42, supplement 57: P. 4094
8. Лямина, С. В. Функциональный фенотип иммунного ответа и анализ собственного фенотипа альвеолярных макрофагов при впервые выявленном и рецидивирующем течении саркоидоза органов дыхания [Текст] / Лямина С. В., Демьяненко Н.Г., Шелухина С.В., Ловачева О.В., Шмелев Е.И., Малышев И.Ю. // Тезисы 24 Национального конгресса по болезням органов дыхания. – 2013.- Москва.- С. 236-237.
9. Демьяненко, Н.Г. Показатели цитокинового профиля в динамике у пациентов с впервые выявленным саркоидозом [Текст] / Н.Г. Демьяненко, Е.И. Шмелев // Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей. Тезисы на Российскую научно-практическую конференцию молодых ученых с Международным участием ФГБНУ «ЦНИИТ». – 2014.- Москва.- С 52-56.
10. Демьяненко, Н.Г. Клинические и иммуно-цитологические особенности впервые выявленного и рецидивирующего саркоидоза [Текст] / Н.Г. Демьяненко // Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей. Тезисы на Российскую научно-практическую конференцию молодых ученых с Международным участием ФГБНУ «ЦНИИТ». - 2015 . – Москва.- С 87-89.
11. Лепеха, Л.Н. Цитология бронхоальвеолярного смыва в оценке вариантов течения саркоидоза органов дыхания [Текст] / Л.Н. Лепеха, Г.В. Евгущенко, Н.Г. Демьяненко // Сборник научных трудов «Актуальные вопросы военной фтизиатрии». – 2015.- Том 1.- Пушкино.- С. 70-76.
12. Демьяненко, Н.Г. Клинико-иммунологические показатели у пациентов с рецидивирующим течением саркоидоза [Текст] / Н.Г. Демьяненко, С.В. Шелухина // Тезисы на Российскую научно-практическую конференцию молодых ученых, посвященную всемирному дню борьбы с туберкулезом ФГБНУ «ЦНИИТ». 2013.- Москва - С 21 – 24.

13. Демьяненко, Н.Г. Клинико-иммунологические показатели у больных с впервые выявленным саркоидозом на фоне 6-месячной противовоспалительной терапии [Текст] / Н.Г. Демьяненко, С.В. Шелухина // Тезисы на Российскую научно-практическую конференцию молодых ученых, посвященную всемирному дню борьбы с туберкулезом. – 2013. – Москва. - С 60-63.
14. Демьяненко, Н.Г. Иммуно-цитологические особенности бронхо-альвеолярного лаважа у пациентов с впервые выявленным и рецидивирующим саркоидозом [Текст] / Н.Г. Демьяненко // Сборник трудов Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященный всемирному дню борьбы с туберкулезом. – 2016. - Москва - С. 30-33
15. Демьяненко, Н.Г. Макрофагальный и цитокиновый спектры бронхоальвеолярного смыва при впервые выявленном и рецидивирующем саркоидозе органов дыхания [Текст] / Н.Г. Демьяненко, Л.Н. Лепеха, Е.И. Шмелев, М.М. Авербах, Т.А. Стацук, И.В. Сивокозов // Туберкулез и болезни легких. – 2016. - № 9.– С. 59-64.
16. Демьяненко, Н.Г. Макрофагальный спектр бронхоальвеолярного смыва при впервые выявленном и рецидивирующем саркоидозе органов дыхания [Текст] / Н.Г. Демьяненко // Сборник трудов Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященный всемирному дню борьбы с туберкулезом ФГБНУ «ЦНИИТ». – 2017.- Москва – С. 192-194.

### Список сокращений

АМ- альвеолярные макрофаги

БАС-бронхоальвеолярный смыв

БАЛ-бронхоальвеолярный лаваж

ЖЕЛ - жизненная емкость легких

ИЛ - интерлейкины

МЭ - макрофагальные элементы

МОС (75, 50, 25) - минутная объемная скорость выдоха при выдохе 75, 50 и 25%

МФ - макрофагальная формула

МСКТ - мультиспиральная компьютерная томография

ОФВ1- объем форсированного выдоха за 1 секунду

РО - респираторные отделы

СГКС - системные глюкокортикостероиды

СОД - саркоидоз органов дыхания

ТЭМ – трансмиссионно - электронная микроскопия

ЭЦ - эндопульмональная цитограмма

РаО<sub>2</sub> - парциальное давление кислорода

РаСО<sub>2</sub>- парциальное давление углекислого газа

DLCO/SB - диффузионная способность легких

DLCO/SB - коэффициент диффузии

TNF - фактор некроза опухоли

Th - Т-хелперы



INF - интерферон