

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

М.В. Шипилов

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ
У БОЛЬНЫХ ПАРАГРИППОМ

УДК 616.9-07-092-037

Обследовано 19 больных парагриппом средней степени тяжести, в возрасте 15-54 лет, у которых заболевание протекало благоприятно, без осложнений, с целью определения концентрации противовоспалительных цитокинов (IL-1Ra, IL-4 и IL-10) в сыворотке крови больных парагриппом. Кровь забирали в остром и реконвалесцентном периодах заболевания. Контролем служила кровь здоровых доноров (n = 18). Определено повышение уровня всех исследованных цитокинов как в остром периоде заболевания, так и в периоде реконвалесценции. Установлена активация противовоспалительного звена "цитокиновой сети" в течение всего заболевания, косвенно свидетельствующая о высокой активности эффекторных клеток крови, синтезирующих данные цитокины. Полученные результаты были использованы при создании экспертной системы "Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ".

Ключевые слова: парагрипп, рецепторный антагонист интерлейкина-1, интерлейкин-4, интерлейкин-10.

The aim was to determine the concentration of anti-inflammatory cytokines (IL-1Ra, IL-4 and IL-10) in the serum of patients with parainfluenza. We examined 19 patients with moderate parainfluenza aged 15-54 years who have the disease run a positive, without complications. Blood were taken during the acute period of disease and reconvalescent. Served as control blood of healthy donors (n = 18). Defined increase in all investigated cytokines in the acute period of disease and during convalescence. We set the activation level of anti-inflammatory "cytokine network" throughout the disease, indirectly indicating the high activity of effector cells of blood, synthesizing data cytokines. The results were used to create an expert system "Quick diagnosis and prognosis of ARVI".

Keywords: parainfluenza, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, interleukin-10.

Введение. Противовоспалительные цитокины – цитокины, которые, даже в минимальных (пикограммовых) концентрациях, тормозят активность клеток, участвующих в воспалении, в результате чего происходит угнетение воспалительной реакции в целом. К противовоспалительным цитокинам относятся IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β . К тому же, противовоспалительными свойствами обладают антагонисты рецепторов провоспалительных цитокинов, растворимые рецепторы к цитокинам воспаления и антитела к провоспалительным цитокинам, блокирующие их эффекты. Антагонисты рецепторов провоспалительных цитокинов, среди которых наиболее изученным является антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra), структурно сходны с провоспалительными цитокинами, поэтому они связываются с соответствующими рецепторами и блокируют дальнейшее развитие воспалительной реакции. Также описаны обладающие сходным действием растворимые рецепторы к IL-1 (sIL-1R), IL-2 (sIL-2R), IL-6 (sIL-6R), TNF (sTNFR) и антитела к IL-1 и TNF [4, 8].

Из вышеперечисленных важнейшими противовоспалительными биологическими регуляторами являются IL-1Ra, IL-4 и IL-10. По структуре они представляют собой белки с молекулярной массой 15-36 кДа. IL-1Ra в острой фазе воспаления продуцируют

преимущественно макрофаги и моноциты, а также нейтрофилы, фибробласты, гепатоциты, эндотелиальные клетки, дендритные клетки. Механизм действия IL-1Ra заключается в блокаде клеточного рецептора, специфического для IL-1 α и IL-1 β ; тем самым происходит регуляция активности мощных цитокинов воспаления семейства IL-1 в месте внедрения и репликации вируса, в том числе и нежелательных их эффектов для организма при избыточной концентрации не только в месте воспаления, но и в системном кровотоке. Т.о. именно оптимальный баланс соотношения IL-1Ra и IL-1 обеспечивает адекватную реакцию организма в ответ на внедрение чужеродного агента, в том числе и вируса, а изменение этого баланса неизбежно приводит не только к нарушению функционирования цитокиновой сети, но и иммунной системы в целом [4, 8].

В отличие от IL-1Ra, IL-4 и IL-10 продуцируют преимущественно активированные Th2-лимфоциты, а также моноциты, макрофаги, В-лимфоциты, NK-клетки, кератиноциты, тучные клетки и др. под действием TNF- α , IFN- α , IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, IL-15 и других провоспалительных цитокинов. Основная функция IL-4 и IL-10 состоит в изменении иммунного ответа с Th1 на Th2 [4]. IL-4 и IL-10 – мощные противовоспалительные и иммуносупрессивные факторы, ингибирующие избыточный синтез провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IFN- α и др.) активированными макрофагами и Th1-лимфоцитами, что приводит к ослаблению избыточного влияния медиаторов вос-

паления на организм человека и к одновременной активации гуморального ответа организма, выражающейся в прогрессивном повышении секреции Ig E и Ig G. В то же время, выработку противовоспалительных цитокинов ингибируют активированные липополисахаридом и IFN- γ моноциты [4, 8].

В связи с тем, что в норме в организме человека существует баланс между активностью Th1- и Th2-лимфоцитов, в результате которого поддерживается гомеостаз между различными системами организма: иммунной, кроветворной, нервной, эндокринной и др. [1, 4, 8], именно в дизрегуляции цитокинопосредованных механизмов кооперации Т-лимфоцитов ряд исследователей видит причину утяжеления клинической картины различных заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы [5, 8].

Проведенные к настоящему времени исследования концентрации противовоспалительных цитокинов при острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ) достаточно фрагментарны. Однако многие учёные [10-12] указывают на их исключительную важность в патогенезе ОРВИ. Так, повышенный уровень основных противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, IL-1Ra) был зарегистрирован в носоглоточной слизи детей раннего возраста с тяжёлым, но благоприятным течением респираторно-синцитиальной вирусной инфекции [11]. Повышение концентрации IL-4 в сыворотке крови было определено у взрослых больных не только респираторно-синцитиальной, но и аденовирусной инфекцией [2]. Повышение уровня IL-1Ra и IL-10 в

периферической крови было выявлено у больных как среднетяжёлым течением гриппа pH1N1, так и с тяжёлым течением заболевания с развитием острого респираторного дистресс-синдрома [12].

В связи с тем, что в доступной нам литературе мы не встретили работ по изучению уровня противовоспалительных цитокинов у больных парагриппом, **целью** настоящей работы явилось исследование уровня основных противовоспалительных медиаторов (IL-1Ra, IL-4, IL-10) в крови данных больных с объяснением их возможной патогенетической и прогностической роли.

Материалы и методы исследования. Нами обследовано 19 больных парагриппом средней тяжести в возрасте 15-54 лет, у которых заболевание протекало благоприятно, без осложнений. Диагноз был подтверждён с помощью реакции непрямой гемагглютинации (выявлением специфических антител с ростом их титра в 4 и более раза).

Забор крови для определения уровня противовоспалительных цитокинов производили в остром периоде (1-2 день болезни) и периоде ранней реконвалесценции (на 7-9-й день болезни). Уровень цитокинов определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа коммерческими тест-системами ЗАО "Вектор-Бест", Россия [7]. Контролем служила кровь 18 здоровых доноров в возрасте 19-40 лет.

Результаты клинических и лабораторных исследований были внесены в специально разработанные карты индивидуального обследования пациентов с последующим представлением в виде электронных таблиц Microsoft Excel 2007. Статистическая обработка результатов исследований была проведена с использованием пакета StatGraphics 15.0.

Нормальность распределения вариационных рядов (соответствие закону Гаусса) проверяли с помощью критериев согласия Колмогорова-Смирнова,

Пирсона и Шапиро-Вилкса, одного из самых мощных критериев нормальности [3]. При выполнении гипотезы нормальности распределения в качестве точечной оценки характеристики центра группирования значений случайной величины использовалось выборочное среднее (Mo). В случае нормального распределения каждой из выборок межгрупповые различия выявляли при помощи t-критерия Стьюдента (СТ) и точного критерия Фишера для сравнения дисперсий (Ф) [3, 6].

Наиболее часто распределение рядов не соответствовало критериям нормальности, что согласуется с литературными данными. Так, по некоторым данным [6], только 20% распределений количественных признаков, встречающихся в медико-биологических исследованиях, являются приближённо нормальными. При невыполнении гипотезы нормальности распределения в соответствии с рекомендациями [6] были использованы методы непараметрической статистики. В частности, в качестве точечной оценки характеристики центра группирования значений случайной величины использовали медиану (Me) – показатель наименее подверженный влиянию со стороны индивидуальных колебаний признака [3, 6]. Между собой выборки сравнивали с помощью непараметрических критериев: Вилкоксона-Манна-Уитни (ВМУ) – рангового критерия, хорошо приспособленного для анализа малых выборок и робастного к виду закона их распределения, а также двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова (КС) [3, 6].

Содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 в крови большинства пациентов находились ниже порога чувствительности метода лабораторного анализа [7], вследствие чего выборки с результатами лабораторных анализов имели "0" в большинстве позиций. Это обстоятельство привело к нулевому значению оценки медианы (Me = 0) и невозможности сравнения выборки по данному пара-

метру [3]. С учётом того, что содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 в крови пациентов было распределено по экспоненциальному закону (в связи с выполнением критерия экспоненциальности распределения Шапиро-Уилка [3]), в качестве точечной оценки характеристики центра группирования значений данных факторов мы использовали выборочное среднее (Mo) [3, 6, 7].

Уровень значимости при проверке всех статистических гипотез – $p = 0,05$ (доверительная вероятность $> 0,95$).

Результаты и обсуждение. В остром периоде парагриппа выявлена повышенная концентрация всех противовоспалительных цитокинов в сравнении с контролем (таблица): IL-1Ra (ВМУ, КС $p = 0,05$), IL-4 (Ф, КС $p = 0,001$) и IL-10 (ВМУ, КС $p = 0,01$). Высокий уровень данных противовоспалительных факторов сохранялся и не приходил в норму к периоду реконвалесценции: IL-1Ra (ВМУ $p = 0,05$), IL-4 (Ф, КС $p = 0,001$) и IL-10 (КС $p = 0,001$). В течение всего заболевания (в сравнении острого периода и периода реконвалесценции) повышенный уровень IL-1Ra статистически значимо не изменялся (СТ, Ф, ВМУ, КС $p > 0,05$). В то же время к периоду реконвалесценции выявлено статистически значимое прогрессивное увеличение концентрации IL-4 (приблизительно в два раза) (КС $p = 0,001$) и достоверное уменьшение уровня IL-10 (в 6,5 раза) (ВМУ, КС $p = 0,01$).

Выводы. В связи с преобладающим местным (дистантным), а не системным действием исследованных противовоспалительных цитокинов, быстрым разрушением и/или связыванием их со специфическими рецепторами (в течение 10-15 минут) – все это обуславливает то, что их концентрация в периферической крови недостаточно полно отражает те процессы, которые происходят в зоне воспаления. Однако трудности исследования концентрации противовоспалительных цитокинов и активности соответствующих клеточных популяций по их синтезу в месте воспаления обуславливают необходимость поиска косвенных признаков, характеризующих ограничение протекания воспалительной реакции и активацию гуморального звена иммунитета, в которой данные цитокины играют ключевую роль.

Согласно результатам проведенного исследования, у больных парагриппом выявлена значительная активация противовоспалительного звена «цитокиновой сети» в течение всего периода заболевания, что косвенно свидетель-

Сравнительная характеристика концентрации противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных парагриппом

Группы больных	Показатели	Me (для IL-1Ra) или Mo (для IL-4 и IL-10), диапазон значений (указан в скобках), пг/мл	
		Острый период	Период реконвалесценции
Парагрипп	IL-1Ra	1275,3 (648,4 - 3000) [#] , n = 17	1371,5 (489,3 - 3000) [#] , n = 16
	IL-4	0,127 [#] , n = 16	0,223 [#] , n = 14
	IL-10	44,319 [#] , n = 18	6,808 [#] , n = 16
Контроль	IL-1Ra	619,55 (74,7 - 3000), n=16	
	IL-4	0,021 (0 - 0,334), n = 16	
	IL-10	5,970 (0 - 88,951), n=17	

* Достоверные различия показателей в динамике заболевания ($p = 0,05$), [#] Достоверное отличие от контроля ($p = 0,05$), n – число обследованных пациентов.

ствуется о высокой активности эффекторных клеток крови: макрофагов и моноцитов (согласно высокому уровню IL-1Ra) и Th2-лимфоцитов (судя по высокой концентрации IL-4 и IL-10). Еще большее повышение концентрации IL-4 к периоду реконвалесценции, по-видимому, обусловлено прогредившим усилением активности Th2-лимфоцитов в связи с их возрастающим участием в процессах синтеза антител против антигена вируса парагриппа, прежде всего Ig G. Однако отсутствие нормализации уровня IL-1Ra, участвующего преимущественно в ранней фазе иммунного ответа и вырабатываемого преимущественно моноцитами/макрофагами, может свидетельствовать о сохранении высокой активности и этих клеток крови. Таким образом, у больных парагриппом выявлено неполное совпадение клинического и лабораторного выздоровления, что следует учитывать при выписке больного из стационара.

Практическая значимость. Определено прогностическое значение высокого уровня противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови с их динамикой в течение заболевания у больных среднетяжелой формой парагриппа. Полученные данные о состоянии основных противовоспалительных факторов цитокиновой сети в норме и у больных парагриппом легли в основу разработанной нами экспертной системы «Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ» [9].

Литература

1. Иванов А.А. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии / А.А. Иванов, О.П. Гладких, А.В. Кузнецова, Т.И. Данилова // Молекулярная медицина. – 2005. – №2. – С. 16-21.
2. Климова Ю.А. Клиническое течение и цитокиновый статус при аденовирусной и респираторно-синцитиальной вирусной инфекциях у взрослых: автореф. дис... канд. мед. наук. / Ю.А. Климова. – М., 2011. – 24 с.
3. Klimova Y.A. The clinical course and cytokine status with adenovirus and respiratory syncytial virus infections in adults: Author. dis... cand. med. science. / Y.A. Klimova. – Moscow, 2011. – 24 p.
4. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников / А.И. Кобзарь. – М.: Физматлит, 2006.
5. Kobzar A.I. Applied Mathematical Statistics. For engineers and scientists / A.I. Kobzar. – Moscow, Fizmatlit, 2006.
6. Нароев Б.С. О роли цитокинов в регуляции иммунной системы при инфекционных заболеваниях / Б.С. Нароев, М.Х. Нароева, Э.А. Камбачокова // Материалы III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням (Москва, 28-30 марта 2011 года) // Инфекционные болезни. – 2011. – Т.9. – Прил. №1. – С. 260.
7. Nagev B.S. The role of cytokines in the regulation of the immune system in infectious diseases / B.S. Nagev, M.H. Nageva, E.A. Kambachokova // Proceedings of the III Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases (Moscow, March 28-30, 2011). – Infectious diseases. – 2011. – Vol. 9. – Appendix №1. – P. 260.
8. Новицкий В.В. Молекулярные механизмы нарушения взаимодействия эффекторных клеток крови при патологии инфекционной и неинфекционной природы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – №4. – 36-48.
9. Novitsky V.V. Molecular mechanisms of disorders of the effector interactions of blood cells in the pathology of infectious and noninfectious nature / V.V. Novitsky, N.V. Ryazantseva, L.S. Litvinova // Bulletin of Siberian Branch of RAMS. – 2008. – № 4. – P. 36-48.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002.
11. Rebrova O.Y. Statistical analysis of medical data. Application software package STATISTICA / O.Y. Rebrova. – Moscow: MediaSphere, 2002.
12. Рябичева Т.Г. Определение цитокинов методом иммуноферментного анализа / Т.Г. Рябичева, Н.А. Вараксин, Н.В. Тимофеева, М.Ю. Рукавишников // Информационный бюллетень «Новости «Вектор-Бест». – 2004. – № 4, т. 34. – С. 4.
13. Ryabicheva T.G. Determination of cytokines by enzyme immunoassay / T.G. Ryabicheva, N.A. Varaksin, N.V. Timofeeva, M.Y. Rukavishnikov // Newsletter «News» Vector-Best. – 2004. – № 4. – Vol. 34. – P. 4.
14. Симбирцев А.С. Цитокины - новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – №1. – С. 9-17.
15. Simbirtsev A.S. Cytokines – a new system of regulation of defense reactions / A. S. Simbirtsev // Cytokines and inflammation. – 2002. – № 1. – P. 9-17.
16. Усков А.А. Экспертная система «Экспресс-диагностика и прогноз течения ОРВИ» / А.А. Усков, М.В. Шипилов // Информатика, математическое моделирование, экономика: сб. науч. статей по итогам Международной научно-практической конф. (Смоленск, 22 апреля 2011 г.) – Смоленск, 2011. – Т.1. – С. 185-188.
17. Uskov A.A. Expert system «Express-diagnosis and prognosis of ARVI» / A.A. Uskov, M.V. Shipilov // Computer science, mathematical modeling, economics: a collection of scientific papers to the International Scientific Conference (Smolensk, april 22, 2011). – Smolensk, 2011. – Vol.1. – P. 185-188.
18. Belz G.T. Regulating inflammatory diseases. Life in the balance: killer T-cell self control fends off lethal influenza? / G.T. Belz // Immunology and Cell Biology. – 2009. – № 87. – P. 364-365.
19. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children / J.F. Bermejo-Martin, M.C. Garcia-Arevalo, R.O. de Lejarazu [et al.] // Eur. Cytokine Netw. – 2007. – Vol. 18, №3. – P. 162-167.
20. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza / J. F. Bermejo-Martin, R.O. de Lejarazu, T. Pumarola [et al.] // Crit. Care. – 2009. – Vol. 13, №6. – P. 201.

Е.П. Аммосова, Е.Н. Сивцева

РОЛЬ БОЛЕЗНЬ-МОДИФИЦИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ В ЛЕЧЕНИИ ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ У ДЕТЕЙ

УДК 616-002.77

Проанализирована эффективность четырех схем базисной терапии у 97 детей с ограниченной склеродермией. В результате разработан дифференцированный подход к назначению той или иной базисной терапии с учетом клинического течения заболевания.

Ключевые слова: ограниченная склеродермия, лечение, Д-пеницилламин, метотрексат.

АММОСОВА Елена Петровна – к.м.н., научн. руковод. группы исследований болезней детского возраста НИИ здоровья СВФУ им. М.К. Аммосова, ammosovael@mail.ru;
СИВЦЕВА Елена Николаевна – к.м.н., н.с. НИИ здоровья СВФУ им. М.К. Аммосова, sivelya@mail.ru.

The authors analyzed the effectiveness of therapy four schemes of basic therapy in 97 children with localized scleroderma. As a result, developed a different approach to the appointment of the basic therapy, taking into account the clinical current of disease.

Keywords: localized scleroderma, treatment, D-penicillamine, methotrexate.

Введение. Ограниченная склеродермия (ОС) характеризуется вовлечением в склеродермический процесс кожи, подкожной клетчатки, мышц и

нередко костной ткани [1,3]. Распространенность ограниченной склеродермии у взрослых составляет 2,7 случаев на 100000 популяции, из них