

УДК: 612.017:615.834:615.83+615.34:547:616.24

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ПОЛЛИНОЗОМ С ХОЛЕСТЕРОЗОМ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ ДО И ПОСЛЕ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

■ Н. В. Немировская, ассис. каф. клин., лабор. иммунол. и аллергол.

■ Национальная медицинская академия последипломного образования им. П. Л. Шупика, Киев

Задачей настоящего исследования явилось изучение больных поллинозом с холестерозом желчного пузыря (П с ХЖП). Нами доказано, что за последние 5 лет в Украине наблюдается тенденция к увеличению количества пациентов не только страдающих поллинозом (П), но и страдающих поллинозом с холестерозом желчного пузыря, что требует дополнительного лечения сопутствующего заболевания и иммунотерапии.

Данный факт обуславливает необходимость учитывать патогенетические механизмы функционального нарушения иммунной системы у больных П с ХЖП, при этом большое внимание уделяется исследованию кооперативных взаимодействий между клетками иммунной системы, обеспечиваемых секрецией и рецепцией цитокинов.

Целью нашей работы является изучение клеточной кооперации у больных поллинозом с холестерозом желчного пузыря.

Материалы и методы исследования

Было изучено 120 больных П с ХЖП в возрасте от 37 до 57 лет, средний возраст ($46,3 \pm 5,5$) лет, до и после традиционного лечения – аллерген-специфической иммунотерапии; 20 практически здоровых лиц, доноров крови, служили контрольной группой для иммунологических показателей.

Понятие цитокины объединяет в себе большое количество эндогенных биологически активных соединений, включающих интерлейкины (в настоящее время описано около полутора десятков интерлейкинов), интерфероны, колониестимулирующие факторы, трансформирующие факторы, факторы, некротизирующие опухоли, и ряд других соединений. В формировании аллергического воспаления принимает участие множество различных медиаторов воспаления, их функции во многом взаимосвязаны, но о течении воспалительного процесса с определенной долей вероятности можно судить по некоторым цитокинам, играющим центральную роль в развитии воспалительной реакции. К их числу относятся интерферон (ИНФ- γ), а также фактор некроза опухолей (ФНО- α) и интерлейкин 1 (ИЛ-1 β) [7, 9, 11].

Известно, что попадание в организм антигена активирует макрофаги и вызывает секрецию ими ряда медиаторов, в том числе и ИЛ-1 β , стимулирующего пролиферацию Т-клеток и являющегося главным медиатором

развития местной воспалительной реакции при любом типе воспаления. Кроме того, доказано, что в физиологических условиях ИЛ-1 β способен повышать активность Th1-клеток, стимулируя секрецию ими ИНФ- γ . В норме доминирующей секреторной формой у человека является ИЛ-1 β , тогда как практически весь ИЛ-2 остается внутри клетки или в связанном с цитоплазматической мембраной состоянии. При различных патологических процессах имеет место повышение содержания в интерстициальной жидкости ИЛ-1 β .

Таким образом, при патологическом процессе наибольшую информативность может нести обнаружение в биологических средах организма секреторной формы ИЛ-1 β . В связи с этим нам представилось актуальным провести сопоставление содержания в сыворотке крови ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО- α и ИНФ- γ .

Клетки крови инкубировали в течение 7 часов при 37 °С (спонтанный синтез) и стимулировали липополисахаридом (ЛПС) *Escherichiacoli* (серотип 055:B5, 10 мкг/мл), «Sigma». Количественное определение уровня синтеза цитокинов проводили через 3 часа от начала инкубации с интервалом в 1 час. Пробирки охлаждали, центрифугировали 10 минут при 800 g, супернатант отбирали и охлаждали. Дальше выделение цитокинов проводили специфическим методом ИФА. Вначале были определены оптимальные параметры времени стимуляции синтеза цитокинов клетками крови, что позволяет завершить первую фазу эксперимента (инкубацию) в течение 6-8 часов. Известно, что при стимуляции клеток ЛПС увеличение концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4 определяется как минимум через 3 часа. Было доказано, что за 6 часов инкубации клетки способны выделять увеличенное количество цитокинов. Синтез цитокинов за данное время не достигает своего максимума, но имеют достоверную разницу ($P < 0,001$) между стимулированным и спонтанным их синтезом (1) [1, 2, 4, 6, 7, 9, 11].

Найденное время инкубации является достаточным для определения уровня синтеза цитокинов, что позволяет сравнивать уроне иммунокомпетентных клеток у больных и здоровых людей до наступления динамического равновесия между секрецией и активацией цитокинов.

Результаты исследования и их обсуждение

Способность клеток крови больных синтезировать

Таблица 1

Время спонтанного и ЛПС-индуцированного синтеза цитокинов больных П с ХЖП ($M \pm m$)

Показатели (пг/мл)	Время инкубации в часах						
	1	2	3	4	5	6	7
ФНО- α							
Спонт. А	15,1 $\pm$ 2,3	16,8 $\pm$ 4,5	17,8 $\pm$ 5,8	18,7 $\pm$ 4,6	20,7 $\pm$ 6,8	25,1 $\pm$ 10,1	25,3 $\pm$ 5,8
Б	16,7 $\pm$ 5,0	26,5 $\pm$ 4,5	36,9 $\pm$ 6,7	39,8 $\pm$ 7,7	46,7 $\pm$ 7,9	56,1 $\pm$ 12,2	54,2 $\pm$ 11,3
Индук. А	307 $\pm$ 11,0	300 $\pm$ 12,1	320 $\pm$ 12,5	380 $\pm$ 14,6	430 $\pm$ 12,4	501 $\pm$ 11,1	500 $\pm$ 13,4
Б	350 $\pm$ 10,1	360 $\pm$ 9,8	400 $\pm$ 11,2	457 $\pm$ 14,6	530 $\pm$ 15,7	630 $\pm$ 112	625 $\pm$ 100
ИЛ-1 β							
Спонт. А	50,9 $\pm$ 1,3	55,8 $\pm$ 4,6	60,8 $\pm$ 6,7	65,8 $\pm$ 4,5	74,5 $\pm$ 5,5	80,4 $\pm$ 10,2	76,7 $\pm$ 9,7
Б	450 $\pm$ 11,2	460,5 $\pm$ 14	510 $\pm$ 14,8	590 $\pm$ 18,9	610 $\pm$ 15,6	733 $\pm$ 104	734 $\pm$ 100
Индук. А	1345 $\pm$ 10	1450 $\pm$ 8,9	1560 $\pm$ 7,7	1670 $\pm$ 10	1760 $\pm$ 10	1855 $\pm$ 9,6	1850 $\pm$ 9,8
Б	3100 $\pm$ 123	3508 $\pm$ 120	3608 $\pm$ 110	3798 $\pm$ 120	3998 $\pm$ 128	4725 $\pm$ 175	4730 $\pm$ 567
ИЛ-4							
Спонт. А	13,1 $\pm$ 1,2	13,6 $\pm$ 1,4	14,2 $\pm$ 1,3	15,9 $\pm$ 1,5	20,1 $\pm$ 1,2	24,8 $\pm$ 2,5	24,9 $\pm$ 3,5
Б	50,1 $\pm$ 4,8	55,7 $\pm$ 2,9	60,1 $\pm$ 3,1	68,8 $\pm$ 3,4	75,5 $\pm$ 3,6	81,3 $\pm$ 6,7	81,5 $\pm$ 6,5
Индук. А	150,1 $\pm$ 20	160,5 $\pm$ 34	170,5 $\pm$ 24	210 $\pm$ 45	250,4 $\pm$ 67	250,1 $\pm$ 80	247,1 $\pm$ 77
Б	156,1 $\pm$ 30	160,5 $\pm$ 45	178,8 $\pm$ 32	215 $\pm$ 47	268,9 $\pm$ 57	260,1 $\pm$ 79	260,2 $\pm$ 57

Примечание: А – показатели здоровых людей (доноров крови); Б – показатели больных П с ХЖП.

ФНО- α при стимуляции клеток ЛПС было значительно выше в сравнении с такими же клетками у здоровых людей. Полученные результаты соответствуют данным литературы о способности клеток крови больных П с ХЖП синтезировать провоспалительные цитокины в увеличенном объеме *in vitro*, а также об увеличении количества провоспалительных цитокинов в крови больных П с ХЖП. Но наибольшие различия между больными П с ХЖП и здоровыми донорами выявились при сравнении спонтанной секреции ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, которая включает их базальный синтез и синтез, стимулированный ЛПС *E.coli*, который индуцирован минимальным влиянием, что неизбежно при заборе крови. Если клетки здоровых доноров в покое продуцировали небольшое количество цитокинов, то их синтез клетками крови больных П с ХЖП без дополнительной стимуляции был на уровне ЛПС-индуцированного синтеза клетками крови здоровых людей-доноров крови [1, 9, 10, 11].

ФНО- α является одним из основных провоспалительных цитокинов, которые отвечают за индукцию клеточного иммунитета, гиперпродукция этого фактора ведет к увеличению синтеза у ряда других цитокинов и факторов, которые участвуют в клеточной активации, смещения баланса Th1/Th2-ответа в сторону Th1-ответа (табл. 1).

Результаты клинической эффективности лечения больных П с ХЖП представлены в таблице 2, где прослеживается закономерность нормализации показателей цитокинов, которые мы изучали в результате традиционного лечения.

Обращает на себя внимание нормализация ИЛ-4 и увеличение количества ИЛ-1 β , что объясняется большим количеством аллергенов, которые поступили в организм человека, что является одним из вариантов защитной функции организма человека и проявлением специфического иммунитета.

Полученные нами результаты свидетельствуют о

способности клеток крови секретировать цитокины у больных П с ХЖП в период ремиссии и у здоровых людей. Наиболее ярко эти отличия прослеживаются в случаях спонтанной клеточной реактивности, что позволяет использовать данный параметр в качестве одного из диагностических признаков при оценке иммунологической реактивности и эффективности лечения. У больных П с ХЖП после проведенного лечения количество ФНО- α и ИЛ-4 значительно уменьшилась, а секреция ИЛ-1 β осталась на высоком уровне, очевидно, в ответ на длительное поступление аллергенов [4, 5, 8, 9, 11].

В связи с этим, нам представляется актуальным проведение сравнения содержимого в сыворотке крови ИЛ-1 β , ФНО- α и ИНФ- γ и клинической характеристики больных П с ХЖП с целью выявления возможных клиничко-иммунологических критериев тяжести патологического процесса. Были обследованы больные П с ХЖП при разной степени тяжести патологического процесса – при средней степени тяжести процесса были обследованы больные 3-ей группы – 35 человек, при легкой степени тяжести – 25 человек, в состоянии ремиссии – 40 больных П с ХЖП. Полученные нами данные демонстрируют достоверную зависимость концентрации уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови от тяжести течения П с ХЖП. В особенности выраженные нарушения

Таблица 2

Показатели продукции цитокинов у больных П с ХЖП в динамике лечения ($M \pm m$)

Показатели, (пг/мл)	Здоровые люди (n = 20)	Больные П с ХЖП (n = 120)	
		до лечения	после лечения
ФНО- α	25 $\pm$ 1,5	562 $\pm$ 55,7*	44,7 $\pm$ 3,7**
ИЛ-1 β	80,40 $\pm$ 10,1	733,6 $\pm$ 104,8*	730,0 $\pm$ 121,6
ИЛ-4	25,15 $\pm$ 1,5	81,3 $\pm$ 13,5*	27,3 $\pm$ 6,3**

Примечание: * – достоверная разница в сравнении больных П с ХЖП со здоровыми людьми; ** – достоверная разница до и после лечения больных П с ХЖП.

Таблица 3

Уровень ФНО- α , ИЛ-1 β , ИНФ- γ (М $\pm$ m) в сыворотке крови у больных П с ХЖП при среднем и легком течении (пг/мл)

Цитокины	Течение П с ХЖП средней степени тяжести (n = 35)	Легкое течение П с ХЖП (n = 25)	Ремиссия (n = 40)
ФНО- α	117,16 $\pm$ 38,45*	86,91 $\pm$ 14,61**	86,09 $\pm$ 29,23***
ИЛ-1 β	108,12 $\pm$ 60,23*	48,57 $\pm$ 32,49**	37,67 $\pm$ 25,38
ИНФ- γ	87,18 $\pm$ 17,51*	84,98 $\pm$ 18,15**	127,18 $\pm$ 94,05

Примечание: достоверности полученных результатов по сравнению тяжести процесса и состояния ремиссии: * – П с ХЖП средней тяжести, ** – легкое течение П с ХЖП

отмечены у пациентов во время средней тяжести течения П с ХЖП. Выявленные нарушения достоверно отличались от значений в группе сравнения (таблица 3).

Аналогичные изменения отмечены и при анализе уровня ИЛ-1 β в сыворотке крови. При средней тяжести П с ХЖП отмечено почти десятикратное повышение его сывороточного уровня в сравнении с ремиссией заболевания. Также отмечено трехразовое повышение уровня данного цитокина при П с ХЖП легкой степени тяжести. Не найдено вероятных расхождений в содержании ИЛ-1 β у пациентов, которые находятся в ремиссии и при легком течении П с ХЖП. Отмечен сниженный, в сравнении с группой сравнения, уровень ИНФ- γ при течении П с ХЖП любой степени тяжести. Выявленные изменения для средней степени тяжести течения П с ХЖП и легком течении П с ХЖП были практически не различимы в исследуемых группах, но достоверно не отличались от показателей в группе сравнения [2, 4, 7, 9, 11].

Таким образом, при анализе уровня ряда провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных П с ХЖП при различной степени тяжести патологического процесса нами отмечено значительное возможное повышение уровня ИЛ-1 β и ФНО- α при течении средней степени тяжести патологического процесса и умеренное повышение их сывороточного содержания – при легкой степени тяжести. Данные литературы свидетельствуют, что провоспалительная реакция за счет ИНФ- γ , активируя макрофагальную составляющую иммунитета, является прямым индуктором синтеза ИЛ-1 β , которая обусловлена влиянием специфического антигена, в большей степени, и в меньшей степени – при инфекционном воспалении. ИЛ-1 β в физиологических условиях способен усиливать продукцию ИНФ- γ путем активации Th1-клеток [4, 10].

Таким образом, высокая степень взаимосвязи их сывороточного содержания является физиологической [7, 10, 11]. Исходя из этого, нам представилось интересным провести корреляционное исследование между концентрациями этих цитокинов при различной степени тяжести патологического процесса у больных П с ХЖП (таблица 4).

Результатами нашего исследования подтверждается наличие взаимосвязи между концентрациями ИНФ- γ прямой связи между содержащимся в сыворотке крови ИНФ- γ и ИЛ-1 β . Установлено, что сила этой связи имеет обратно пропорциональную зависимость от тяжести патологического процесса у больных П с ХЖП. Так, если в период ремиссии П с ХЖП коэффициент корреляции был близок

Таблица 4

Корреляционные связи между исследуемыми цитокинами (r)

Больные П с ХЖП	ФНО- α		ИЛ-1 β
	ИЛ-1 β *	ИНФ- γ **	ИНФ- γ ***
Средней степени тяжести (n = 35)	-0,15	-0,11	0,59
Легкой степени тяжести (n = 25)	0,021	0,123	0,726
Больные ПсХЖП в состоянии ремиссии (n = 40)	0,191	0,124	0,949

Примечание: Корреляционные связи: * – между ФНО- α и ИЛ-1 β ; ** – между ФНО- α и ИНФ- γ ; *** – между ИЛ-1 β и ИНФ- γ .

к единице (r = 0,949), то при легком течении, значения коэффициента корреляции составили соответственно 0,726 и 0,59. Возможных коэффициентов корреляции между другими парами показателей содержимого цитокинов не получено ни в одной группе пациентов [1-6, 10].

Итак, результатами нашего исследования подтверждается наличие взаимосвязи между концентрациями ИНФ- γ и ИЛ-1 β в плазме, причем выявлена обратная зависимость между силой описываемой корреляционной связи и тяжестью патологического процесса П с ХЖП, что может свидетельствовать в пользу нарушения иммунорегулирующих механизмов контроля атопического воспаления в зависимости от тяжести течения П с ХЖП.

Принимая во внимание полученные нами данные, которые свидетельствуют о снижении концентрации сывороточного ИНФ- γ в период обострения ХП, а также учитывая его значение в патогенезе атопического воспаления, мы считаем, что при тяжелом течении у больных П с ХЖП отмечаются возможное нарушение ИЛ-1 β опосредованной продукции ИНФ- γ Th1-клетками, которые в числе других факторов, возможно, приводят к недостаточному синтезу данного цитокина клетками-продуцентами. Степень выраженности этих нарушений прямо пропорциональна тяжести течения П с ХЖП. Также не исключено, что активация макрофагальной составляющей иммунитета, которая имеет место при обострении П с ХЖП, может оказывать содействие повышению продукции макрофагами веществ, которые ингибируют синтез ИНФ- γ [1, 4, 7, 9, 11].

Выводы

1. Тяжесть патологического процесса у больных П с ХЖП характеризуется высоким содержанием ФНО- α и ИЛ-1 β в сыворотке крови, которая коррелирует с его тяжестью.

2. После проведенного лечения определены неяркие признаки снижения активности Th2-составляю-

щей иммунной системы – нормализация уровня ИЛ-4 в сыворотке крови.

3. Нормализация уровня сывороточного ФНО-α – одного из факторов, который дестабилизирует базофильные клетки, может рассматриваться как положительный эффект лечения у больных П с ХЖП.

4. При лечении больных П с ХЖП на фоне лечения сохраняется высокий уровень спонтанной продукции

ИЛ-1β, возможно, в ответ на длительное поступление аллергенов [6, 9, 11].

5. Для острого периода П с ХЖП характерно независимое от степени тяжести приступа снижение концентрации в сыворотке крови ИНФ-γ. Это может быть теоретической предпосылкой для использования препаратов ИНФ-γ в комплексной терапии больных П с ХЖП.

Література

1. Алергологія. // Під ред. д. мед. н., проф. Кузнецової Л. В. – Київ. – 2008 р. – 365 с.
2. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Дранник. – К.: Полиграф Плюс. – 3-е изд. – 2006. – 482 с.
3. Дранник Г. М. Клінічна імунологія та алергологія / К.: Здоров'я. – 2006. – С. 772-779.
4. Иммунопатология и аллергология. Алгоритмы диагностики и лечения / Под общ. ред. Р. М. Хаитова. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 112 с.
5. Казмирчук В. Е., Ковальчук Л. В. Клінічна імунологія та алергологія. – Вінниця: Нова книга, 2006. – 528 с.
6. Клиническая аллергология / Под ред. Р. М. Хаитова / М.: «Медпресс-информ» – 2002. – 624 с.
7. Клиническая иммунология и аллергология (под ред. Г. Лолора мл., Т. Фишера, Д. Адельмана). – М.: Практика. – 2000. – 806 с.

8. Клінічна імунологія та алергологія. Навч. посібник / За ред. членкор. АМНУ, д. м. н., проф. О. М. Біловола, д. мед. н., проф. П. Г. Кравчуна, д. мед. н., проф. В. Д. Бабаджана. д. мед. н., проф. Л. В. Кузнецової / Харків: «Гриф». – 2011. – 550 с.

9. Клінічна та лабораторна імунологія. Національний підручник / За заг. ред. д. мед. н., проф. Кузнецової Л. В., д. мед. н., проф. Бабаджана В. Д., д. мед. н., проф. Фролова В. М. – ООО «Полиграфплюс». – Київ. – 2012. – 922 с.; ил.

10. Кузнецова Л. В. Лікувальна тактика при невідкладних станах в алергології. Навчальний посібник для лікарів / Л. В. Кузнецова. – 2008. – 37 с.

11. Кузнецова Л. В. Поліноз та його прояви: діагностика, особливості лікування. Монографія / Л. В. Кузнецова. – Київ. – 2009. – 92 с.

Поступила в редакцию 29.05.2014

УДК: 612.017:615.834:615.83+615.34:547:616.24

Н. В. Немировська

ВМІСТ ЦИТОКІНІВ У ХВОРИХ НА ПОЛІНОЗ З ХОЛЕСТЕРОЗОМ ЖОВЧНОГО МІХУРА ДО ТА ПІСЛЯ АЛЕРГЕНСПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ

Ключові слова: поліноз, холестероз жовчного міхура, алергенспецифічна імуноterapia.

Було вивчено 120 хворих на поліноз з холестерозом жовчного міхура у віці від 37 до 57 років до та після лікування алергенспецифічною імунотерапією.

При патологічному процесі найбільшу інформативність несе вивчення в біологічних середовищах організму секреторної форми ІЛ-1β. У зв'язку з цим провели порівняння в сироватці крові ІЛ-2, ІЛ-4, ФНП-α, ІНФ-γ.

Після проведеного лікування визначені непрямі ознаки зниження активності Th-2-складової імунної системи – нормалізація рівня ІЛ-4 в сироватці крові.

Н. В. Немировская

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ПОЛЛИНОЗОМ С ХОЛЕСТЕРОЗОМ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ ДО И ПОСЛЕ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

Ключевые слова: поллиноз, холестероз желчного пузыря, алергенспецифическая иммуноterapia.

Было изучено 120 больных П с ХЖП в возрасте от 37 до 57 лет, до и после традиционного лечения – алергенспецифической иммунотерапии.

При патологическом процессе наибольшую информативность может нести обнаружение в биологических средах организма секреторной формы ИЛ-1β. В связи с этим, нам представилось актуальным провести сопоставление содержания в сыворотке крови ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α и ИНФ-γ.

После проведенного лечения определены непрямые признаки снижения активности Th-2-составляющей иммунной системы – нормализация уровня ИЛ-4 в сыворотке крови.

N. V. Nemyrovska

THE CYTOKINESIN PATIENTS WITH POLLINOSIS CHOLESTEROSIS GALLBLADDER BEFOR AND AFTER ALLERGENSPECIFIC IMMUNOTHERAPY

Keywords: pollinosis, cholesterosis gallbladder allergenspecific immunotherapy.

We examined 120 patients with pollinosis and cholesterosis gallbladder, aged 37 to 57 years, before and after treatmentallergen specific immunotherapy.

In pathological process has the most informative study in biological media body secretory form of IL-1β. In this regard, a comparison conducted in serum IL-2, IL-4, TNF-α, IFN-γ.

After treatment by indirect signs of decreased activity of Th-2-component of the immune system – the normalization of IL-4 in serum.

