



Л.Ф. Притуло

## ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИММУНОКОРРЕКЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ И ЦИТОКИНОВ Т-ХЕЛПЕРОВ 1, 2 ТИПОВ У ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ СЕПТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ФЛОРОЙ

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь

**Ключові слова:** *ендотоксин, цитокини, синдром септичної інфекції, імуноткорекція.*

**Ключевые слова:** *эндотоксин, цитокины, синдром септической инфекции, иммунокоррекция.*

**Key words:** *endotoxin, cytokines, septic infection syndrome, immunocorrection.*

Проведено дослідження у 26 дітей з діагнозом «синдром септичної інфекції». Всі пацієнти були розділені шляхом випадкової вибірки на 2 групи. В 1 групу ввійшли 14 дітей, у яких проводилася патогенетична імуноткорекція з використанням плазми донорів збагачених антитілами до ендотоксину; в 2 групу – 12 дітей, у яких проводилося тільки комплексне лікування. При синдромі септичної інфекції, викликаного грам-негативними збудниками, на 1, 7, 14 добу спостерігається гіперсекреція прозапальних медіаторів, що пов'язана із пригніченням цитокінів гуморального профілю (ІЛ-4, ІЛ-10) і активацією клітинних (ІЛ-2, ІФ- $\gamma$ ). Призначення патогенетичної імуноткорекції з використанням плазми донорів збагаченої антитілами до ендотоксину в дітей із синдромом септичної інфекції приводить до достовірного ( $P < 0,05$ ) зниження рівнів прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6, ФНП- $\alpha$  на 7, 14 добу в порівнянні із групою, у якій проводилася стандартна терапія.

Проведено исследование у 26 детей с диагнозом «синдром септической инфекции». Все пациенты были разделены путем случайной выборки на 2 группы. В 1 группу вошли 14 детей, у которых проводилась патогенетическая иммунокоррекция с использованием плазмы доноров, обогащенной антителами к эндотоксину; во 2 группу - 12 детей, у которых проводилось только комплексное лечение. При синдроме септической инфекции, вызванного грам-негативными возбудителями, на 1, 7, 14 сутки наблюдается гиперсекреция провоспалительных медиаторов, которая связана с притеснением цитокинов гуморального профиля (ИЛ-4, ИЛ-10) и активацией клеточных (ИЛ-2, ИФ- $\gamma$ ). Назначение патогенетической иммунокоррекции с использованием плазмы доноров, обогащенной антителами к эндотоксину у детей с синдром септической инфекции приводит к достоверному ( $P < 0,05$ ) снижению уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  ИЛ-6, Фнп- $\alpha$  на 7, 14 сутки в сравнении с группой, у которой проводилась стандартная терапия.

There were research at 26 children with diagnosis of septic infection syndrome. All patients have been parted by a random way on 2 groups. 1 group included 14 children at whom the pathogenetic immunocorrection of plasma donors enriched by antibodies to an endotoxin was used; in 2 group - 12 children at whom complex treatment was used only. At a syndrome of the septic infection, invoked gram-negative originators, for 1, 7, 14 days observe a hypersecretion of proinflammatory mediators which is connected to suppression of cytokines of a humoral profile (IL-4, IL-10) and activation cellular (IL-2, IF- $\gamma$ ). Appointment of a pathogenetic immunocorrection with use of plasma of donors enriched by antibodies to an endotoxin at children with a septic infection syndrome leads significant ( $P < 0,05$ ) to depression of levels of proinflammatory cytokines ИЛ-1  $\beta$ , ИЛ-6, TNF- $\alpha$  for 7, 14 days in comparison with group of standard.

Сепсис является десятой по значимости причиной смерти в США [1]. Недавнее исследование в Германии установило повсеместное распространение сепсиса среди пациентов, госпитализированных в палату интенсивной терапии, где распространенность тяжелого сепсиса была в 11% случаев. Смертность в палате интенсивной терапии для этих пациентов была 48,4% [2].

Септическая реакция инициируется, когда бактериальные продукты, такие как эндотоксин (липополисахарид (ЛПС)), стимулируют моноциты крови и тканевые макрофаги посредством связывания с Toll-like рецепторами, экспрессируемыми на клеточной мембране моноцитов. В последующем, происходит трансдукция сигнала на внутриклеточный сигнальный путь, который ведет к активации ядерного фактора NF- $\kappa$ B, экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов, среди которых наиболее изученными являются ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИЛ-10 [4]. Гиперпродукция этих цитокинов может привести к синдрому полиорганной дисфункции, ДВС-синдрому и гипергликемии.

Малое количество медиаторов способно активировать макрофаги, тромбоциты, выброс из эндотелия молекул адгезии, продукцию гормона роста. Развивающаяся острофазовая реакция контролируется провоспалительными медиаторами (интерлейкинами IL1, IL6, IL8, фактором некроза опухоли — TNF и др.) и их

эндогенными антагонистами, такими как IL4, IL10, IL13, растворимые рецепторы к TNF и др., получившими название противовоспалительных медиаторов [5]. За счет поддержания баланса и контролируемых взаимоотношений между про- и противовоспалительными медиаторами в нормальных условиях создаются предпосылки для заживления ран, уничтожения патогенных микроорганизмов, поддержания гомеостаза, а при сепсисе наблюдается резкая дисрегуляция высвобождения этих цитокинов с преобладанием провоспалительных [6].

Целесообразность включения внутривенных иммуноглобулинов в терапию при септическом процессе (IgG и IgG + IgM) связана с их возможностью ограничивать избыточное действие провоспалительных цитокинов, повышать клиренс эндотоксина, устранять анемию, усиливать эффект бета-лактамных антибиотиков. Использование внутривенных иммуноглобулинов в рамках иммунозаместительной терапии тяжелого сепсиса и септического шока является в настоящее время единственным реально доказанным методом иммунокоррекции при сепсисе, повышающим выживаемость [7-11].

В литературе практически не раскрыты механизмы влияния специфической, пассивной иммунокоррекции направленной на элиминацию эндотоксемии у детей с различными гнойно-септическими состояниями и



синдромом септической инфекции.

В связи с этим, **ЦЕЛЬЮ** нашей **РАБОТЫ** стало изучение влияния патогенетической иммунокоррекции на содержание провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1, 2 типов у детей с синдромом септической инфекции, вызванной грам-отрицательной флорой.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения влияния патогенетической иммунокоррекции на содержание провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1, 2 типов при синдроме септической инфекции, вызванном грам-отрицательной флорой проведено исследование у 26 детей госпитализированных в хирургическое отделение Республиканской детской клинической больницы г.Симферополя.

В соответствии с клиническими диагнозами было исследовано 9 детей с гнойно-деструктивной пневмонией (ОГДП); 6 – с острым гематогенным остеомиелитом; 11 - с перитонитом.

Для проведения патогенетической иммунокоррекции все пациенты были разделены путем случайной выборки на 2 группы. В 1 группу вошли 14 детей, у которых проводилась патогенетическая иммунокоррекция с использованием плазмы доноров обогащенных антителами к эндотоксину; во 2 группу – 12 детей, у которых проводилось комплексное лечение без иммунокоррекции.

Комплексное лечение включало: хирургические пособия, антибактериальную терапию, интенсивную терапию, реабилитацию.

Иммунокоррекция проводилась на 2-3 сутки с использованием регионального банка плазмы постоянных доноров обогащенной антителами к эндотоксину. Заготовка, транспортирование и методы введения плазмы соответствовали рекомендациям МОЗ Украины и Академии медицинских наук Украины.

Контрольную группу составили 110 условно здоровых детей того же возраста и пола.

Для определения синдрома септической инфекции была использована классификация, принятая на конференции IPSSC в 2005 г [12].

#### ИНФЕКЦИЯ

Предполагаемая или доказанная (высев возбудителя, гистологическое подтверждение инфекции или положительные данные полимеразной цепной реакции), вызванная любым патогеном или клинические синдромы, ассоциированные с высокой вероятностью инфекции. Доказательство инфекции включает в себя позитивные находки или клиническое объяснение методов визуализации или лабораторных тестов (таких как лейкоциты в стерильных жидкостях организма, перфорация внутреннего органа, рентгенографические данные подтверждающие наличие пневмонии, петехиальная или пурпурная сыпь или острая пурпура).

Исследование концентрации цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИФ- $\gamma$ ) в сыворотке крови осуществляли иммуноферментным методом на основе двухэтапного процесса с пероксидазой хрена в качестве индикаторного

фермента. Использовали наборы реагентов «Diacolone» для определения ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и «Immunotech» для ИФ- $\gamma$  (Франция). Измерение активности связанной пероксидазы проводили на автоматическом фотометре для микропланшетов «Stat Fax 2100» (США).

Для определения провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ) использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа при помощи тест-систем производства института им. Л. Пастера (Санкт-Петербург) и ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург). Содержание цитокинов выражали в пг/мл.

Содержание СРБ в сыворотке крови определяли «сэндвич»-вариантом тИФА с использованием биотин-стрептавидиновой системы усиления сигнала. Источником антител к СРБ служила коммерческая овечья антисыворотка к СРБ человека производства ООО «Микрофлора» при МНИИ им. Г.Н. Габричевского (Россия). Оптическую плотность конечного продукта ферментативной реакции определяли с помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 2100 (Awareness Tech. Inc., USA) при длине волны 492 нм. Содержание СРБ выражали в мкг/мл.

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ООО «Альфа», г.Донецк.

При анализе для проверки распределения на нормальность использовали Хи-квадрат и критерий W Шапиро-Уилка, сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с использованием W-критерия Вилкоксона и сравнение средних двух независимых выборок по критерию Стьюдента. Для множественного сравнения использовали ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса и критерий Дана [13].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания провоспалительных цитокинов и медиаторов клеточного и гуморального профиля представлен в *таблице 1*.

Как видно из данных в *таблице 1*, на 1 сутки в группе 1 и 2 было выявлено достоверное повышение провоспалительных цитокинов по сравнению с контрольной группой ( $P < 0,01$ ). При этом достоверных отличий между группами установлено не было ( $P > 0,05$ ). Содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 на первые сутки было достоверно снижено, а ИЛ-2, ИФ- $\gamma$  достоверно выше по сравнению с контролем в обеих группах ( $P < 0,01$ ), которые также не отличались между собой.

На 7 сутки показатели провоспалительных цитокинов всё ещё были достоверно выше контроля в обеих группах, но для ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  снижение уровня было более значимо в группе 1, чем в группе 2 ( $P < 0,05$ ). Для ИЛ-2, СРБ и ИФ- $\gamma$  достоверных отличий между группами на 7 сутки не выявлено ( $P > 0,05$ ). На те же сутки уровень ИЛ-10 в группе 1 был достоверно выше ( $P < 0,05$ ), чем в группе 2, но оба они отличались от показателя контрольной группы, в то же время, показатель ИЛ-4 достоверно не отличался между группами и был статистически значимо ниже

Содержание провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1, 2 типов в зависимости от метода лечения у детей с синдромом септической инфекции, вызванным грам-отрицательной инфекцией, на 1, 7, 14 сутки

Показатели	Контроль (n=110)	На 1-е сутки		На 7-е сутки		На 14-е сутки	
		Метод 1 (n=14)	Метод 2 (n=12)	Метод 1 (n=14)	Метод 2 (n=12)	Метод 1 (n=14)	Метод 2 (n=12)
ИЛ-1 $\beta$	16,36 $\pm$ 0,75	72,64 $\pm$ 5,06*	71,07 $\pm$ 6,50*	41,66 $\pm$ 2,67* &	57,60 $\pm$ 5,95*	23,56 $\pm$ 1,60 * # # &	43,04 $\pm$ 5,67*
ИЛ-6	31,16 $\pm$ 0,65	63,17 $\pm$ 6,23*	62,65 $\pm$ 8,20*	40,37 $\pm$ 4,99** &&	52,73 $\pm$ 7,03*	28,38 $\pm$ 2,63 # &	42,56 $\pm$ 5,43*
ФНО-альфа	16,97 $\pm$ 0,68	87,76 $\pm$ 14,21*	120,99 $\pm$ 16,43*	46,76 $\pm$ 11,72* &&	96,17 $\pm$ 13,54*	24,82 $\pm$ 2,96 ** # # &	75,94 $\pm$ 11,22*
СРБ	11,82 $\pm$ 0,30	39,08 $\pm$ 5,23*	26,76 $\pm$ 16,17*	30,03 $\pm$ 4,75*	22,03 $\pm$ 13,80*	21,14 $\pm$ 3,57 *	19,14 $\pm$ 11,82*
ИЛ-2	16,17 $\pm$ 0,16	57,64 $\pm$ 7,94*	27,80 $\pm$ 9,01*	39,84 $\pm$ 5,55*	25,61 $\pm$ 8,61*	20,08 $\pm$ 1,40 ** # #	24,27 $\pm$ 8,21*
ИФ-гамма	24,08 $\pm$ 0,38	50,83 $\pm$ 6,24*	37,11 $\pm$ 5,61*	41,72 $\pm$ 5,93*	33,16 $\pm$ 5,26*	26,40 $\pm$ 1,98 # &	30,84 $\pm$ 5,08*
ИЛ-4	148,53 $\pm$ 2,07	59,51 $\pm$ 6,63*	85,57 $\pm$ 8,01*	79,09 $\pm$ 6,07*	92,06 $\pm$ 8,03*	132,37 $\pm$ 3,94 ** # # &	107,98 $\pm$ 9,19*
ИЛ-10	207,55 $\pm$ 2,23	91,64 $\pm$ 7,58*	122,17 $\pm$ 9,63*	149,32 $\pm$ 5,65* &&	132,42 $\pm$ 9,22*	185,90 $\pm$ 4,10 * # # &	147,09 $\pm$ 8,62*

Примечание: \* - P<0,01; \*\* - P<0,05 – достоверность различий показателей опытных групп 1, 2 от контрольной; # - P<0,01; # # - P<0,05 – достоверность различий показателей групп 1, 2 на 1, 7, 14 сутки лечения в пределах одного метода, & - P<0,01; && - P<0,05 – достоверность различия показателей групп 1, 2 при разных методах лечения на одни и те же сутки.

контроля (P<0,01).

Уровень ИЛ-1 $\beta$  на 14 сутки был достоверно выше контроля в обеих группах, причем в группе 1 он отличался от показателей предыдущих суток (P<0,05) и был достоверно ниже, чем в группе 2 (P<0,01). Аналогичная динамика была установлена для ФНО- $\alpha$ . Показатель ИЛ-6 не отличался от контроля в группе 1 на 14 сутки и был достоверно ниже, чем в группе 2. Уровень СРБ был достоверно выше контроля в обеих группах (P<0,01), которые между собой не отличались. Для ИЛ-4 и ИЛ-10 выявлено, что их уровень на 14 сутки был достоверно ниже контроля в группах 1 и 2, причем в между группами было достоверное отличие (P<0,01) с более высокими уровнями для группы 1.

Таким образом, нами было установлено, что при синдроме септической инфекции, вызванного грам-отрицательными возбудителями, на 1, 7, 14 сутки наблюдается гиперсекреция провоспалительных медиаторов, которая связана с угнетением цитокинов гуморального профиля (ИЛ-4, ИЛ-10) и активацией клеточных (ИЛ-2, ИФ- $\gamma$ ). При назначении патогенетической иммунокоррекции с использованием плазмы доноров обогащенной антителами к эндотоксину уровень ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  становится достоверно ниже в группе 1 по сравнению с группой 2 на 7 сутки; кроме того, происходит «нормализация» уровней ИЛ-6 и ИФ- $\gamma$  на 14 сутки в группе 1.

## ВЫВОДЫ

1. При синдроме септической инфекции, вызванного грам-отрицательными возбудителями, на 1, 7, 14 сутки наблюдается гиперсекреция провоспалительных медиаторов, которая связана с угнетением цитокинов гуморального профиля (ИЛ-4, ИЛ-10) и активацией клеточных (ИЛ-2, ИФ- $\gamma$ ).

2. Назначение патогенетической иммунокоррекции с использованием плазмы доноров обогащенной антителами к эндотоксину у детей с синдром септической инфекции приводит к достоверному (P<0,05) снижению уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  на 7, 14 сутки по сравнению с группой, у которой проводилась стандартная терапия.

**Перспективы дальнейших исследований.** С учетом полученных данных о реагировании цитокиновой системы на эндотоксин грам-отрицательной флоры и влияния иммунокоррекции с использованием плазмы доноров обогащенной к эндотоксину у детей с септической инфекцией планируется изучения клинической эффективности данного метода лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Heron M. Deaths: leading causes for 2004. // Natl Vital Stat Rep. – 2007. – Vol.56. – P.1–95.
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from





national prospective multicenter study. // *Intensive Care Med.* – 2007. – Vol.33. – P.606–18.

3. *Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. // *Crit Care Med.* – 2008. – Vol.36. – P.296–327.

4. *Hotchkiss RS, Karl IE.* The pathophysiology and treatment of sepsis. // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol.348. – P.138–50.

5. *Hotchkiss, R.S., Karl, I.E.* The pathophysiology and treatment of sepsis. // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol.348. – P. 138–150.

6. *Mantovani, A., Allavena, P., Vecchi, A., Sozzani, S.* (1998) Chemokines and chemokine receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 versus Th2 responses. // *Int. J. Clin. Lab. Res.* 28, 77–82.

7. *Danner R.L., Elin R.I., Hoseini I.M., et al.* Endotoxin determinations in 100 patients with septic shock // *Clin. Res.* – 1988. Vol. 36. – P. 453–458.

8. *Abraham E., Anzueto A., Gutierrez G., et al.* Doubleblind randomized controlled trial of monoclonal antibody human tumor necrosis factor in treatment of septic shock. // *Lancet.* – 1998. – Vol. 351. – P. 929–933.

9. *Abraham E., Glauser M.P., Butler T., et al.* p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. // *JAMA.* – 1997. – Vol. 277. – P. 1531–1538.

10. *Albertson T.E., Panacek E.A., MacArthur R.D., et al.* Multicenter evaluation of a human monoclonal antibody to Enterobacteriaceae common antigen in patients with Gramnegative sepsis. // *Crit. Care Med.* - 2003. – Vol. 31. – P. 419–427.

11. *Alejandria M.M., Lansang M.A., Dans L.F., Mantaring J.B.V.* Intravenous immunoglobulin for treating sepsis and septic shock (Cochrane review). // *The Cochrane Library.* – 2002. – issue 4. Oxford: Update Software.

12. *Goldstein B., Giroir B., Randolph A. et al.* International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. // *Pediatr. Crit. Care Med.*- 2005.- Vol.6.- P.2-8.

13. *Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях. // *К. – Морион* – 2000 – 319с.

**Адрес для переписки:**

Л.Ф.Притуло - зав. курсом детской хирургии кафедры хирургии № 2  
Крымского государственного медицинского университета им.С.И.Георгиевского, кандидат медицинских наук, доцент.  
ул Чехова д. 34 кв. 33, г.Симферополь, АР Крым 95000  
д.т. 8 (0652) 27-16-60, 8050 9202980